



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

**DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL ASSOCIADO À
BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Campomanesia xanthocarpa* O.
Berg (MYRTACEAE)**

Florianópolis - SC
2013

CRISTINA MAGALHÃES RIBAS DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL ASSOCIADO À
BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Campomanesia xanthocarpa* O.
Berg (MYRTACEAE).**

Programa de Pós-graduação em
Recursos Genéticos Vegetais, Área de
Concentração em Recursos Genéticos
Vegetais: Doutorado, no Centro de
Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Santa Catarina (UFSC).

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro
Guerra

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa
Santos

Florianópolis - SC
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Cristina Magalhães Ribas dos
DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL ASSOCIADO À BIOLOGIA
REPRODUTIVA DE *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg
(MYRTACEAE) / Cristina Magalhães Ribas dos Santos ;
orientador, Miguel Pedro Guerra ; co-orientadora, Marisa
Santos. - Florianópolis, SC, 2013.
428 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Campomanesia*
xanthocarpa. 3. biologia reprodutiva. 4. desenvolvimento
estrutural. 5. polinização cruzada. I. Guerra, Miguel
Pedro. II. Santos, Marisa. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. IV. Título.

“Hoje me dou conta de que todas as coisas têm seu próprio momento e que todo momento chega ao fim. Hoje me dou conta de que todas as coisas desempenham um papel divino em nossas vidas e nos enriquecem. Hoje me dou conta de que existe um novo agora, com novos momentos, com outros objetivos. Nesse momento encho-me de luz e alegria e agradeço por tudo o que vivi!” (Iyanla Vanzant)

Para Carlos Fernando e Ana Laura,
fiéis e valentes companheiros
nesta caminhada.
Com todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Professor Dr. Miguel Pedro Guerra por ter acolhido e orientado este trabalho, oportunizando meu crescimento profissional.

À Professora Dr^a. Marisa Santos pela paciência e orientação competente neste processo de aprendizagem.

À Família Agapito, proprietária do sítio onde estão as plantas de *Campomanesia xanthocarpa*. Sem a oportunidade para as coletas, seria muito difícil desenvolver todas as etapas deste trabalho.

Para Céres A. Ribas Hubner, porque sempre está presente nos momentos importantes da minha vida.

RESUMO

Os recursos genéticos de um país, com rica diversidade biológica como o Brasil, possuem expressivo potencial de uso para a alimentação humana e animal, obtenção de fibras, pigmentos, condimentos, energia, princípios ativos para produção de medicamentos, além de representarem um reservatório de adaptabilidade genética frente às mudanças ambientais. As Mirtáceas nativas destacam-se como fonte potencial para diversos usos, por isso, existe a necessidade de melhor estudar esses recursos. Neste sentido, o presente trabalho buscou elucidar aspectos ligados à biologia reprodutiva da Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.) associados ao desenvolvimento estrutural dos botões florais, elucidar os aspectos estruturais da fecundação cruzada e de um possível mecanismo de autoincompatibilidade atuante, bem como estudar o desenvolvimento de frutos, sementes e embriões. Os resultados mostraram que a etapa de florescimento dura, em média, 18 dias podendo-se dividir os estádios de desenvolvimento dos botões florais em B, C, D1, D2, E (estádio balão) e F (antese). O desenvolvimento dos andrófitos mostrou que os mesmos são capazes de emitir o tubo polínico a partir do estádio D1. Em relação ao desenvolvimento dos rudimentos seminiais, a partir do estádio D1 ocorreu a intensificação da formação das estruturas de proteção e a formação do saco embrionário, embora este se complete somente no estádio E. A espécie investe em estruturas de proteção nas sépalas (cutícula, glândulas de óleo e tricomas) e em mecanismos ligados à rota transpiratória estomática e à fotossíntese (abundância de complexos estomáticos e cloroplastos). As pétalas servem de mecanismo de proteção ao androceu e ao gineceu até a antese, devido à presença de glândulas de óleo e ao formato convexo das células. O androceu polistêmone provavelmente assume papel de atração aos polinizadores pela abundância de pólen e material proteico que produz, além de desenvolver as anteras que garantem a produção de gametas funcionais e facilitam a sua dispersão no momento da antese, favorecendo a polinização cruzada. O gineceu estrutura-se de forma a facilitar a adesão e a germinação dos grãos de pólen compatíveis, o crescimento dirigido dos tubos polínicos, a cópula e a descarga dos gametas nos rudimentos seminiais, com a consequente singamia, promovendo, assim a fecundação. As glândulas de óleo e os tricomas secretores são estratégias extras adotadas pela espécie, no sentido de preservar as partes florais dos estresses ambientais, bióticos e abióticos, a fim de garantir a perpetuação e a ocupação de novos espaços em seu hábitat

natural. O pólen coletado na fase balão de desenvolvimento dos botões florais pode ser utilizado em polinizações controladas e esta espécie apresenta alta eficiência reprodutiva, pois os tubos polínicos germinam duas horas após a polinização cruzada, crescendo rapidamente e de forma organizada, do estigma ao ovário, com a penetração nos rudimentos seminiais três dias depois. Devido ao comportamento dos tubos polínicos depois da polinização geitonogâmica pode-se concluir que existe barreira à autofecundação, sendo a Incompatibilidade Homomórfica Gametofítica o mecanismo que melhor explica este comportamento. Os frutos levam, cerca de, 42 dias para se desenvolverem num padrão sigmoidal que pode ser dividido em 5 estádios. Devido às estruturas ovarianas formadoras do fruto já estarem presentes na pré-antese, esta fase de desenvolvimento da flor foi incluída como estágio I. O estágio II é o mais longo (30 dias) e abrange eventos como a fecundação e a embriogênese (proembriões, embriões globulares, embriões nos estádios cordiforme e de torpedo, até sua forma mirtóide definitiva). O estágio III marca o início do amadurecimento perceptível dos frutos através da mudança de coloração e aumento em diâmetro. O estágio IV é um período de 2 dias com amadurecimento pleno dos frutos e aprimoramento de padrões sensoriais. O estágio V é o início da rápida senescência dos frutos da espécie. Os frutos apresentam estruturas de proteção desde a epiderme (tricomas e glândulas de óleo) até as regiões mais internas. Para garantir a dispersão das sementes, a espécie investiu na região mediana do pericarpo, formada por tecido parenquimático rico em substâncias nutritivas que garantem a recompensa para os dispersores. As sementes estão estruturadas de modo a proteger o embrião (cobertura com mucilagem e substâncias oriundas das glândulas de óleo, reserva alimentar no eixo hipocótilo-radicular e na hipóstase), mas a característica recalcitrante e o curto período de viabilidade dificultam sua utilização.

Palavras-chave: *Campomanesia xanthocarpa*, biologia reprodutiva, desenvolvimento estrutural, polinização cruzada, autoincompatibilidade.

ABSTRACT

Genetic resources of a rich biodiversity country such as Brazil, have high use potential for human and animal consumption, obtaining fibers, pigments, spices, active principles for drug production, and represent a pool of genetic adaptability in relation to environmental changes. Native Mirtaceae species stand out as a potential source for several uses. Taking this into account the present work seeks to elucidate aspects of the reproductive biology of Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) associated to the structural development of the flower buds, as well as to elucidate the structural aspects of cross-fertilization and a possible mechanism of self-incompatibility active and to follow the development of fruits, seeds and embryos. The results showed that the flowering stage takes about 18 days, dividing the development of floral buds in B, C, D1, D2, E (balloon stage) and F (total opening of the flower) stages. The pollen grains are able to emit the pollen tube starting from D1 stage. After the stage D1 it takes place the intensification of protective structures and the formation of the embryo sac, although this is complete only in E stage. The species invests in protective structures on the sepals (cuticle, oil glands and trichomes) and mechanisms related to transpiratory, photosynthetic and stomatal routes (stomatal complexes and chloroplasts). The petals are protection mechanisms for the androecium and the gynoecium until the complete flower opening, due to the presence of the oil glands and the convex shape of the cells that form a barrier around the reproductive organs. The androecium polystaminate probably assumes the role of pollinator attraction due to the abundance of pollen and protein material, in addition to developing anthers which guarantee the production of functional gametes and facilitate their dispersion at the anthesis, favoring cross pollination. The gynoecium is structured to facilitate the adhesion and the germination of the compatible pollen grains, directing the growth of pollen tubes, thus facilitating coupling and the discharge of the gametes in the seminal rudiments with consequent syngamy and fertilization. Oil glands and trichomes are other strategies adopted by the *C. xanthocarpa* in order to preserve the flowers of environmental, biotic and abiotic stresses, to ensure the perpetuation of this species and the occupation of new spaces in their natural habitat. The pollen collected in the balloon stage of flower buds can be used in controlled pollinations. This species shows high reproductive efficiency because the pollen tubes germinate two hours after cross-pollination, growing rapidly and in an organized manner, the stigma to the ovary with penetration, three days later, in the

seminal rudiments. Due to the behavior of pollen tubes after self-pollination, it can be concluded that there is a barrier to self-fertilization and homomorphic gametophytic incompatibility is the mechanism that best explains this behavior. The fruits take approximately 42 days to develop, following a sigmoid pattern that can be divided into 5 stages. The pre anthesis already had ovarian structures formative of the fruit and thus this phase of flower development was adopted as stage I. The stage II is the longest (30 days) and encompasses events like as fertilization and embryogenesis (pro embryos, globular embryos, the embryos in the cordate and torpedo stages, until its final form mirtóide). The III stage marks the beginning of the perceptible ripening of fruits by changing color and increase in diameter. The stage IV is a rapid period (2 days) for full ripening of fruits with enhancement of sensory patterns. The V is the beginning stadium of rapid senescence of the fruits of this species. The fruits have protective structures from the epidermis (trichomes and oil glands) to the more internal regions of the pericarp. In order to ensure seed dispersion, this species has invested in the median region of the pericarp, through the presence of the parenchymal tissue rich in nutrients, ensuring rewards for dispersers. The seeds are structured to protect the embryo (covering it with mucilage and substances contained in the oil glands and through the food reserves in the root-hypocotyl axis and hypostasis) but the recalcitrant characteristic and short viability of the seeds, hinders its use.

Keywords: *Campomanesia xanthocarpa*, reproductive biology, structural development, cross-pollination, self-incompatibility.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
1- JUSTIFICATIVA	21
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 – FAMÍLIA MYRTACEAE:	25
2.2 – <i>CAMPOMANESIA XANTHOCARPA</i> O. BERG	25
2.3 – ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DAS ANGIOSPERMAS	27
2.3.1 - Flores.....	27
2.3.1.1 – Perianto (sépalas e pétalas).....	27
2.3.1.2 – Androceu (estames).....	28
2.3.1.3 – Gineceu (carpelos).....	28
2.3.2 – Frutos	29
2.3.3 – Sementes.....	29
2.4 - CICLO BIOLÓGICO DAS ANGIOSPERMAS	30
2.5 – FECUNDAÇÃO.....	30
2.6 - AUTOINCOMPATIBILIDADE (AI).....	31
2.6.1 - Autoincompatibilidade homomórfica gametofítica (AIG) ...	31
2.6.2 - Autoincompatibilidade homomórfica esporofítica (AIE)	32
2.6.3 - Autoincompatibilidade heteromórfica (AIH)	32
2.6.4 - Autoincompatibilidade críptica (AIC)	33
2.6.5 - Autoincompatibilidade de ação tardia (AIT)	33
2.7 – POLINIZAÇÃO CRUZADA.....	34
2.8 – AUTOINCOMPATIBILIDADE EM <i>C. XANTHOCARPA</i>	34
2.9 – BIODIVERSIDADE	35
2.10 – DOMESTICAÇÃO DE PLANTAS	35
2.11 – CULTIVO DE PLANTAS	36
2.12 – CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS	36
3 – OBJETIVOS DA TESE.....	37
3.1 - OBJETIVO GERAL	37
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
SEÇÃO I	
DESENVOLVIMENTO DO PERIANTO, DO ANDROCEU E DO GINECEU DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg (MYRTACEAE).....	45

RESUMO.....	51
--------------------	-----------

INTRODUÇÃO.....	53
------------------------	-----------

1. METODOLOGIA.....	55
----------------------------	-----------

1.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES:	55
--	----

1.2 – COLETA DOS RAMOS FLORAIS DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	55
--	----

1.3 - ANÁLISE MORFOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO DO PERIANTO, DO ANDROCEU E DO GINECEU DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	56
---	----

1.4 – ANÁLISES ESTRUTURAIS DO DESENVOLVIMENTO DO ANDROCEU E DO GINECEU DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	56
---	----

2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
--	-----------

2.1 – ANÁLISES MORFOLÓGICAS DO DESENVOLVIMENTO DO PERIANTO, DO ANDROCEU E DO GINECEU DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	61
---	----

2.2 – ANÁLISES ESTRUTURAIS DO DESENVOLVIMENTO DO ANDROCEU E DOS GRÃOS DE PÓLEN DE <i>C. XANTHOCARPA</i> ..	67
--	----

2.2.1 – Desenvolvimento do androceu	67
--	-----------

2.2.2 – Desenvolvimento dos andrófitos (grãos de pólen)	70
--	-----------

2.3 – ANÁLISES ESTRUTURAIS DO DESENVOLVIMENTO DO GINECEU E DOS RUDIMENTOS SEMINAIS (ÓVULOS) DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	73
--	----

2.3.1 – Desenvolvimento do gineceu	73
---	-----------

2.3.2 – Desenvolvimento dos rudimentos seminais (óvulos)	76
---	-----------

3- CONCLUSÃO.....	81
--------------------------	-----------

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
--	-----------

SEÇÃO II

ANÁLISE ESTRUTURAL DAS PARTES FLORAIS DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg. (MYRTACEAE)	87
--	-----------

RESUMO.....	91
--------------------	-----------

INTRODUÇÃO.....	93
------------------------	-----------

1. METODOLOGIA.....	95
----------------------------	-----------

1.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES	95
---	----

1.2 – COLETA DOS RAMOS FLORAIS DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	95
1.3 - ANÁLISES ESTRUTURAIS DO PERIANTO, DO ANDROCEU, DO GINECEU E DAS ESTRUTURAS SECRETORAS DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	95

2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
2.1 – FLOR DE CAMPOMANESIA <i>XANTHOCARPA</i>	99
2.2 – PERIANTO (CÁLICE E COROLA) DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	99
2.3 – ANDROCEU DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	104
2.4 – GINECEU DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	108
2.5 – ESTRUTURAS SECRETORAS EM <i>C. XANTHOCARPA</i>	113
3- CONCLUSÃO	117
4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

SEÇÃO III

ANÁLISE DO PÓLEN, DA POLINIZAÇÃO CRUZADA E DA POLINIZAÇÃO GEITONOGÂMICA EM <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg. (MYRTACEAE): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO E A DOMESTICAÇÃO.....	123
--	------------

Abstract.....	131
INTRODUCTION.....	133
MATERIAL AND METHODS.....	134
RESULTS AND DISCUSSION.....	136
CONCLUSIONS	151
REFERENCES.....	153

SEÇÃO IV

DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL DE EMBRIÕES, SEMENTES E FRUTOS DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg. (MYRTACEAE).....	159
---	------------

RESUMO	165
---------------------	------------

INTRODUÇÃO.....	167
1. METODOLOGIA.....	169
1.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES	169
1.2 – COLETA DE RAMOS E DE BOTÕES FLORAIS DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	169
1.3 – POLINIZAÇÃO CRUZADA CONTROLADA EM <i>C. XANTHOCARPA</i>	169
1.4 - COLETA DE FRUTOS E EXTRAÇÃO DE SEMENTES E EMBRIÕES ORIUNDOS DA POLINIZAÇÃO CRUZADA CONTROLADA EM <i>C. XANTHOCARPA</i>	171
1.5 - ANÁLISE ESTRUTURAL DE EMBRIÕES, SEMENTES E FRUTOS DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	171
2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	175
2.1 – ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	175
2.2 – DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DE EMBRIÕES E SEMENTES CORRELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	178
2.3 – ANÁLISE ESTRUTURAL DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES E SEMENTES CORRELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	182
2.3.1 – Análise estrutural aos cinco dias após a polinização cruzada.....	182
2.3.2 – Análise estrutural aos dez dias após a polinização cruzada.....	184
2.3.3 – Análise estrutural aos trinta e sete dias após a polinização cruzada.....	187
2.3.4 – Análise estrutural do fruto maduro de <i>C. xanthocarpa</i>	189
2.4 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SEMENTE E DO EMBRIÃO MADURO DE <i>C. XANTHOCARPA</i>	194
3 – CONCLUSÃO.....	199
4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	201

INTRODUÇÃO

Esta tese contém o trabalho desenvolvido com a espécie nativa *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. que buscou elucidar aspectos do desenvolvimento estrutural associado à biologia reprodutiva da planta. Através de coletas em áreas remanescentes de mata nativa de altitude, no interior do município de Alfredo Wagner/Santa Catarina e utilizando diferentes técnicas disponíveis em laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina, foi analisado o desenvolvimento do perianto, do androceu, dos andrófitos, do gineceu e dos rudimentos seminais desta espécie. Procurou-se determinar o comportamento reprodutivo através das polinizações cruzada e geitonogâmica controladas, além de acompanhar o desenvolvimento estrutural de frutos, sementes e embriões. Este documento foi dividido em uma parte introdutória contendo uma revisão bibliográfica e em seções que abordam de forma detalhada o trabalho conduzido durante a realização do Curso de Doutorado em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, no estado de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

1- JUSTIFICATIVA

Os recursos genéticos de um país, com rica diversidade biológica como o Brasil, possuem alto potencial de uso, especialmente no que diz respeito à criação de novas opções voltadas à alimentação humana e animal, obtenção de fibras, madeira, pigmentos, condimentos, energia e fornecimento de princípios ativos para produção de medicamentos. Representam também, o reservatório de adaptabilidade genética, o qual permite às espécies adaptações às mudanças ambientais que se manifestam de forma crescente em todo o planeta (RIDGEN & CAVALCANTI, 2002).

Reconhece-se a importância da grande variabilidade morfológica e fisiológica das espécies nativas, no que se refere à tolerância às condições edafoclimáticas adversas, pois a flora nativa, á milhares de anos interagindo com o ambiente, passou por um rigoroso processo de seleção natural que gerou espécies geneticamente resistentes e adaptadas ao nosso meio (LORENZI, 1992).

Na lista da flora do Brasil publicada recentemente, estão relacionadas 40.989 espécies (FORZZA *et al.*, 2010). A despeito desta riqueza de espécies vegetais nativas, a agricultura brasileira está apoiada na exploração de poucas espécies exóticas domesticadas (LEITE & CORADIN, 2011). O setor agrícola é um dos mais competitivos da economia brasileira, produzindo em torno de 40% do produto interno bruto do país. Este segmento compreende todas as atividades e inter-relacionamentos que ocorrem neste complexo de negócios, do qual participam desde o consumidor final dos produtos agropecuários e seus derivados até chegar às instituições de pesquisa e universidades que são as bases de apoio desta cadeia. Quando se fala em complexo de negócios, não se refere somente à produção de alimentos, mas a outras áreas, como produção de ornamentais, reflorestamento, produção de sementes, arborização urbana, bem como ao novo “Mercado Ecológico”, que engloba os produtos verdes, como os fitoterápicos, a conservação de germoplasma, a recuperação de áreas degradadas, os bioinseticidas, os cosméticos e os corantes (ALMEIDA, 1998).

Uma tendência básica, na sociedade moderna, é a de explorar a natureza, destruindo as riquezas naturais. O conceito de Agronegócio remete a esta tendência exploratória da natureza humana. Nos últimos anos, contudo, observa-se uma mudança neste conceito, quando se vê a modificação do pensamento humano na direção de uma melhor qualidade de vida, saúde e segurança alimentar, baseadas na conservação e respeito à natureza (MAIA, 2000). Para que o potencial

dos recursos genéticos nativos seja efetivamente utilizado, é necessário aprofundar o conhecimento das espécies e de seus usos, bem como adotar estratégias apropriadas e iniciativas voltadas à valorização e ao estímulo do uso dos componentes da flora nativa brasileira, por parte de outros segmentos da sociedade, incluindo a indústria, o comércio e as populações urbanas em geral (LEITE & CORADIN, 2011).

Ainda, segundo Leite & Coradin (2011), na Região Sul do Brasil, o uso dos recursos genéticos vegetais nativos foi muito influenciado pelo processo histórico de ocupação territorial. Os migrantes europeus tiveram papel importante na introdução e disseminação de cultivos comuns nos seus países de origem, tais como centeio, cevada, aveia, uva, maçã, pêra, ameixa e pêssego, entre outras. No final do século XIX e início do século XX, a utilização de recursos florestais nativos alavancou o desenvolvimento dos três estados do sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

A despeito das constantes perdas nas áreas de matas e campos, a vegetação característica da região sul ainda persiste, bem como, ainda persiste certa diversidade de espécies com potencial de uso pela população. Espécies frutíferas como ingá-banana (*Inga uruguensis* Hook. & Arn.), butiá (*Butia capitata* (Mart.) Becc.), araticum (*Annona* sp.), amora (*Rubus* sp.), são utilizadas localmente, fazendo parte da dieta das comunidades locais, especialmente da zona rural (RIZZINI & MORS, 1995). O caraguatá (*Bromelia antiacantha* Bertol.), a guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.), a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek), o pau-andrade (*Persea major* (Nees) L.E.Kopp), a cataia (*Drimys brasiliensis* Miers), o jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman), a bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.), o catiguá (*Trichilia catigua* A.Juss.), a taquara (*Merostachys multiramea* Hack.), o cincho (*Sorocea bonplandii* (Baill.) W.C.Burger, Lanj. & Wess Boer) e o bacupari (*Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi) são exemplos de plantas nativas associadas a diversos usos nas propriedades rurais da região (LEITE & CORADIN, 2011).

As Mirtáceas nativas destacam-se como fonte potencial para diversos usos, especialmente alimentar, medicinal, ornamental, reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e arborização urbana, podendo ser citadas a goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O.Berg) Burret), o sete-capotes (*Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg), a guabirobeira (*C. xanthocarpa* O. Berg), a cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC.), a batinga (*E. rostrifolia* D. Legrand), a pitangueira (*E. uniflora* L.), o araçazeiro-do-mato (*Myrcianthes gigantea* (D. Legrand) D. Legrand), o guabijú (*M. pungens* (O. Berg) D.

Legrand), o araçazeiro-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine), dentre outros (SANTOS, 2003). Atualmente, o uso das mirtáceas nativas da Região Sul está fortemente associado às comunidades locais, sobretudo em pequenas propriedades agrícolas, e às comunidades caiçaras, quilombolas e indígenas, especialmente no que se refere ao uso desses recursos para fins energéticos (lenha), para o consumo esporádico de frutas, além do uso para fins medicinais (LEITE & CORADIN, 2011).

Por isso, existe a necessidade de gerar e disponibilizar tecnologia de uso sustentável, de forma a viabilizar a utilização comercial desses recursos. Para tal, é necessário o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas, para a conservação de germoplasma, a facilitação de intercâmbio de material vegetal e a multiplicação massal das espécies, com o objetivo de valorizar e reintroduzir os recursos vegetais nativos nos sistemas produtivos da região, tais como as espécies nativas de Myrtaceae. Neste sentido, o presente trabalho busca elucidar aspectos ligados à biologia reprodutiva de *Campomanesia xanthocarpa*, espécie negligenciada da família Myrtaceae, classificada como prioritária e apontada com uma “Planta para o Futuro” pelo projeto do Ministério do Meio Ambiente.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – FAMÍLIA MYRTACEAE:

Os sistemas de classificação botânica vêm sofrendo mudanças ao longo do tempo. No presente estudo, adotou-se o sistema Angiosperm Phylogeny Group III (APG III, 2009). Desta forma, a família Myrtaceae pertence à Angiosperma, Eudicotiledoneas Nucleares, Rosidae, clado das Malvídeas, ordem Myrtales. A família compreende cerca de 100 gêneros e 3.000 espécies de árvores e arbustos, com distribuição por todos os continentes, à exceção da Antártida, mas com nítida predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MARCHIORI & SOBRAL, 1997). Constitui-se numa das famílias de melhor representatividade nas diferentes formações vegetacionais do Brasil. Diversos autores (MORI *et al.*, 1983; KLEIN, 1984; LEITÃO-FILHO, 1993; BARROSO & PERON, 1994; SOARES-SILVA, 2000) têm ressaltado a elevada riqueza específica da família e a importância fitossociológica de suas espécies para as florestas do Sul e Sudeste do Brasil.

Os representantes das mirtáceas estão distribuídos em duas subfamílias, Myrtoideae e Psiloxylodeae (WILSON *et al.*, 2005). Myrtoideae inclui todas as espécies americanas e brasileiras, sendo que na vegetação do nosso País, elas abrangem 24 gêneros: *Acca* O. Berg, *Blepharocalyx* O. Berg, *Calyptanthus* SW, *Campomanesia* Ruiz & Pav., *Eugenia* L., *Gomidesia* O. Berg, *Hexachlamys* O. Berg, *Marlierea* Cambess, *Myrceugenia* O. Berg, *Myrcia* DC., *Myrcianthes* O. Berg, *Myrciaria* O. Berg, *Myrrhinium* Schott, *Neomitranthes* D. Legrand, *Paramyrciaria* Kausel, *Plinia* L., *Psidium* L. e *Siphoneugena* O. Berg). As mirtáceas nativas ocupam uma posição de destaque na fisionomia das florestas sul-riograndenses, estando melhores representadas nas Florestas Ombrófila Mista, Pluvial da Encosta Atlântica e, com menor frequência, nas Florestas Estacionais do Alto Uruguai ou da Serra Geral (MARCHIORI & SOBRAL, 1997).

2.2 – *CAMPOMANESIA XANTHOCARPA* O. BERG

Sinonímia: *Campomanesia malifolia* O. Berg

Nomes Comuns: Guavirova, guabiroba, gabirola, guabirobeira-do-mato.

A guabirobeira é uma árvore de 10 a 25m de altura, com tronco provido de caneluras, copa arredondada em indivíduos isolados, com densa folhagem verde-clara, semidecidual e ramos glabros. Folhas opostas, simples, inteiras, longamente peciolodas e com odor característico. Flores solitárias ou em grupos, brancas, axilares, hermafroditas, pentâmeras. Frutos amarelos, globosos e coroados de sépalas, contendo numerosas sementes oval-achatadas com embriões mirtoides. Possui ampla área de distribuição natural, que se estende desde Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, até o norte do Uruguai e Província de Corrientes (Argentina). Habita, preferencialmente, sítios úmidos, na Floresta Estacional Caducifólia e Floresta Ombrófila Densa (MARCHIORI & SOBRAL, 1997). É planta decídua, mesófita e até heliófita e seletiva higrófito. Abundante nas partes úmidas das matas de altitude (semidecíduas e de pinhais), comum na floresta latifoliada semidecídua da bacia do Paraná e rara na mata pluvial da encosta atlântica. Amplamente disseminada pela avifauna que ingere seus frutos (LORENZI, 1992).

A madeira é empregada para tabuado em geral, para confecção de instrumentos musicais e cabos de ferramentas. A árvore apresenta copa piramidal densa bastante decorativa podendo ser empregada no paisagismo em geral. É ótima para o plantio em áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992). A lenha é apreciada para sapecagem e torrefação da erva mate, pois desprende um aroma agradável durante a combustão (CORRÊA, 1984).

Em termos de morfologia e anatomia, a maioria dos trabalhos aborda estudos das partes vegetativas adultas (ramos e folhas), da germinação, das diferentes partes das plântulas da guabiroba ou relacionados ao gênero *Campomanesia*. Neste sentido, salientam-se os trabalhos de Gogosz *et al.* (2010), investigando a germinação e a estrutura das plântulas de *C. xanthocarpa* crescendo em solo contaminado com petróleo e solo bioremediado, e os de Sólis (2000), com estudos morfológicos e anatômicos de folhas com domácias em *C. guaviroba* (DC.) Kiaersk, entre outros.

A maioria dos estudos de composição bioquímica, em *C. xanthocarpa*, concentra as análises nos frutos, tanto em termos de composição nutricional, como de potencial tecnológico, e nas folhas, relacionando o potencial medicinal da guabiroba. Como exemplos, temos os trabalhos de Vallilo (2008), tratando da composição química dos frutos, e os de Klafke (2009), abordando os efeitos em parâmetros bioquímicos, hematológicos e de estresse oxidativo em pacientes hipercolesterolêmicos.

2.3 – ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DAS ANGIOSPERMAS

2.3.1 - Flores

A flor é um ramo altamente modificado constituído de uma haste (pedicelo) e de um receptáculo, de onde emergem os apêndices modificados: sépalas, pétalas, estames e carpelos. Pode apresentar-se solitária ou agrupada em inflorescências. É composta por três conjuntos de órgãos apendiculares: o perianto (apêndices externos de proteção e/ou atração de polinizadores), o androceu e o gineceu. O perianto pode ser diferenciado em cálice (sépalas) e corola (pétalas). O androceu compreende o conjunto de estames (antera e filete) e o gineceu compreende os carpelos (estigma, estilete e ovário) (MARIATH *et al.*, 2006).

O crescimento da flor é determinado, pois o meristema apical cessa a atividade após produzir todas as partes florais (ESAU, 1976). Como estrutura, na qual a reprodução ocorre nas Angiospermas, a flor sofreu várias modificações, durante a coevolução com polinizadores como insetos e pássaros. Estas modificações envolvem estruturas como o perianto e os nectários (BECK, 2009). As flores têm sido estudadas principalmente como fonte de caracteres de importância taxonômica e com relação a filogenia e a evolução, porém, ressaltam Cutler *et al.* (2007), sua função primordial na reprodução também tem sido objeto de muitas investigações morfológicas e fisiológicas. Esses autores acrescentam que os estudos combinados de microscopia eletrônica de varredura e óptica contribuem para esclarecer a evolução das flores e de outras características, como às relacionadas aos nectários florais.

2.3.1.1 – Perianto (sépalas e pétalas)

As sépalas são denominadas coletivamente de cálice. Em muitas flores são verdes e fotossintetizantes (BECK, 2009). Lembram folhas quanto à estrutura interna (parênquima fundamental, sistema vascular mais ou menos ramificado e epiderme). Células portadoras de cristais, laticíferos, células taniníferas e outros idioblastos podem estar presentes. As sépalas verdes contêm cloroplastos, mas raras vezes mostram diferenciação em parênquima paliçádico e esponjoso (ESAU, 1976).

As pétalas são denominadas coletivamente de corola e, junto com o cálice, formam o perianto. Não são fotossinteticamente ativas, mas na forma e na vascularização são muito semelhantes às folhas.

Frequentemente contêm pigmentos e fragrâncias que atraem os polinizadores (BECK, 2009). A cor das pétalas resulta de pigmentos contidos em cromoplastos (carotenoides) e no suco vacuolar (antocianinas) e de diversos outros fatores, como acidez do suco celular. As paredes externas das células epidérmicas das pétalas podem ser convexas ou papilosas, especialmente na face adaxial. Tanto sépalas quanto pétalas podem apresentar estômatos e tricomas na epiderme (ESAU, 1976).

2.3.1.2 – Androceu (estames)

O estame consiste em um filamento longo e frequentemente fino, o filete, que termina numa antera a qual contém, normalmente, quatro microesporângios. Sua principal função é a produção de grãos de pólen, que após a germinação, produzem tubos polínicos que contêm dois gametas (BECK, 2009).

O filete, haste delgada, é provido de um único feixe vascular, que pode ser anficrival, sendo envolvido por parênquima. Este feixe vascular termina no conetivo, região localizada entre as duas tecas da antera. A epiderme destas estruturas é cutinizada e pode ter tricomas e estômatos. A antera contém os microesporângios (sacos polínicos) e outras camadas relacionadas com o desenvolvimento e liberação dos grãos de pólen (ESAU, 1976).

2.3.1.3 – Gineceu (carpelos)

Os carpelos constituem o gineceu que forma o ovário, estilete e estigma. O estigma é o receptor do pólen e a estrutura sobre a qual o pólen germina. O estilete ou estilo é uma extensão fina que une o estigma ao ovário. É uma estrutura especializada na condução dos tubos polínicos em crescimento (MARIATH *et al.*, 2006). Estes autores ainda acrescentam que o estigma e o estilete exercem frequentemente importantes funções no processo de reconhecimento e seleção dos andrófitos nos sistemas de incompatibilidade. O ovário, porção basal, contém os óvulos que, após fecundados, se desenvolvem formando as sementes (BECK, 2009).

No ovário distinguimos a parede e o lóculo (cavidade), um ou vários, neste caso os ovários multiloculados são separados por septos. Os óvulos originam-se na face interna ou adaxial da parede do ovário, região que constitui a placenta, a qual pode ser uma excrescência

conspícua e, em alguns casos, chega quase a obstruir o lume da cavidade ovariana (ESAU, 1976).

Do ponto de vista histológico, já na fase de antese, o ovário e o estilete apresentam epiderme, tecido fundamental parenquimático e feixes vasculares. A epiderme externa é cutinizada, podendo apresentar estômatos. Os óvulos são formados pelo nucelo envolvendo o tecido esporógeno, um ou dois tegumentos de origem epidérmica e um pedúnculo, denominado funículo. Na antese, são formados por parênquima, contendo um sistema vascular (ESAU, 1976). O nucelo é o esporângio, onde ocorre a esporogênese, processo seguido pela transformação do esporo viável em gametófito feminino, que, após fecundado origina o embrião e o endosperma (MARIATH *et al.*, 2006).

2.3.2 – Frutos

As angiospermas apresentam grande variação na natureza e na origem de seus frutos. Há frutos carnosos e secos quando maduros, que provêm somente do ovário da flor. Outros envolvem na sua formação partes florais, como o receptáculo, sépalas, pétalas, estames e o eixo das inflorescências. Porém, o termo fruto é o resultado do desenvolvimento ou amadurecimento do ovário. É composto por duas partes: o pericarpo e a semente. Existe entre o pericarpo e a semente uma relação de dependência fisiológica, estrutural e ecológica (SOUZA *et al.*, 2006).

2.3.3 – Sementes

O termo semente é usado para designar o conjunto formado por um esporófito jovem (embrião), um tecido de reserva alimentar (endosperma) e um envoltório protetor (BELTRATI *et al.*, 2006). Constitui a unidade reprodutiva das espermatófitas, cuja função relaciona-se com a dispersão e a sobrevivência das espécies. Nas angiospermas, segundo os mesmos autores, a semente provém do óvulo como resultado de um processo conhecido como dupla fecundação, em que um dos gametas masculinos une-se ao núcleo da oosfera dando origem ao zigoto diploide e, posteriormente, ao embrião (novo esporófito), enquanto o outro se funde com os dois núcleos polares do saco embrionário dando origem ao endosperma triploide.

2.4 - CICLO BIOLÓGICO DAS ANGIOSPERMAS

Na maioria das plantas, o ciclo biológico envolve duas fases ou gerações: a esporofítica (diploide) e a gametofítica (haploide), com características alternantes (MARIATH *et al.*, 2006). Nas Angiospermas, a geração assexuada, chamada de esporófito, esclarecem os autores, desenvolve-se a partir de uma oosfera fecundada (zigoto) culminando com a formação de uma flor ou inflorescência, produzindo dois tipos de esporos: andrósporos (microsporos, andrófito= grão de pólen) e ginósporos (megásporos, saco embrionário), em seus respectivos esporângios – androsporângio (microsporângios, saco polínico) e ginosporângios (megasporângio, nucelo). A geração sexuada, denominada gametófito, pode ser masculina ou feminina. Os gametófitos masculinos são os andrófitos (grãos de pólen) e os femininos são os ginófitos (sacos embrionários). Nas plantas com sementes, complementam os autores, os gametófitos são plantas sexuadas que dependem nutricionalmente do esporófito e que produzem apenas gametas masculinos ou apenas femininos.

A evolução das plantas vasculares em direção à heterosporia estabelece o caráter unissexual dos gametófitos para todas as plantas com sementes. As gerações gametofíticas passam a ser nutricionalmente esporófito-dependentes, isto é, adquirem a condição parasítica (COCUCCI & MARIATH, 1995).

2.5 – FECUNDAÇÃO

A aproximação dos dois gametas do andrófito aos dois gametas do ginófito efetiva-se em cinco etapas: polinização, acoplamento, cópula, descarga dos gametas e singamia (MARIATH *et al.*, 2006). A polinização consiste no transporte dos andrófitos (grãos de pólen) das anteras até o gineceu da flor. O acoplamento é a fase de aproximação dos gametófitos, desde o estigma, através do tecido transmissor do estilete, até o contato do tubo polínico com o aparelho filiforme das sinérgides. A cópula consiste na penetração de uma sinérgide, mediante o desenvolvimento de um tubo copulador na extremidade do tubo polínico. A descarga dos gametas ocorre após a liberação do conteúdo do tubo polínico no interior da sinérgide. Finalmente, esclarecem os autores, a singamia compreende a fusão de um gameta com a oosfera para formar o zigoto esporofítico (diploide), enquanto o outro gameta fecunda as duas células médias para formar o endosperma (geralmente triploide).

2.6 - AUTOINCOMPATIBILIDADE (AI)

A autoincompatibilidade é um dos mais importantes fenômenos observados em angiospermas e sua ocorrência evita a autofecundação e possibilita manter uma alta diversidade intraespecífica (BARRETT, 1988).

Brewbaker (1959) registrou a ocorrência da autoincompatibilidade em, pelo menos, 71 famílias e em 250 de 600 gêneros estudados. Estudos, realizados em cinco diferentes tipos de florestas neotropicais, indicam uma percentagem variando entre 76 a 86% de espécies autoincompatíveis (GIBBS, 1990).

Em casos extremos, plantas fortemente autoincompatíveis não formam frutos e sementes a partir de flores autopolinizadas, porém, na maioria dos casos, a autoincompatibilidade se expressa por uma baixa produtividade de frutos e sementes em resposta à autopolinização, quando comparado ao número de sementes e frutos formados em resposta à polinização cruzada (BITTENCOURT JR, 2003).

Entre os sistemas de autoincompatibilidade, mais frequentemente estudados nas diversas espécies vegetais, destacam-se: a autoincompatibilidade homomórfica gametofítica (AIG), a homomórfica esporofítica (AIE) e a heteromórfica (AIH). Estes sistemas são geneticamente controlados por mecanismos que previnem a germinação do próprio pólen sobre o estigma, ou impedem o desenvolvimento do tubo polínico até o ovário, caracterizando, neste caso, sistemas de autoincompatibilidade pré-zigótica (GIBBS & BIANCHI, 1999). No entanto, existe um sistema diferenciado de autoincompatibilidade no qual, frutos provenientes de flores autopolinizadas são abortados, determinando um sistema de autoincompatibilidade tardia ou pós-zigótica (SEAVEY & BAWA, 1986).

2.6.1 - Autoincompatibilidade homomórfica gametofítica (AIG)

O termo homomórfico refere-se às flores das espécies que apresentam tal sistema de AI, as quais são morfológicamente homogêneas, ou seja, não variam quanto à altura das anteras e do estigma. Na AIG, os tubos polínicos só irão crescer e só irá ocorrer fecundação se o alelo presente no grão de pólen não estiver presente no tecido diploide do estilete. Nesse processo, o grão de pólen germina e a reação de incompatibilidade ocorre entre o tubo polínico e o estilete (BITTENCOURT JR, 2003). Newbigin *et al.* (1993) supõem que a ação

dos genes S seja ativada após a meiose, havendo envolvimento de RNAses e glicoproteínas. Os tubos polínicos compatíveis apresentam estrutura normal, com deposição reticulada de calose, e os autoincompatíveis desenvolvem um depósito irregular de calose (DE NETTANCOURT, 2000). Existe uma relação entre RNAses e S-glicoproteínas e, portanto, com a reação de incompatibilidade. As RNAses estão presentes desde a superfície das papilas estigmáticas, tecido condutor do estilete, até o ovário, o que coincide com o trajeto do tubo polínico. Supõe-se que as RNAses suspendam o crescimento do tubo polínico por meio da degradação do RNA, mas os processos celulares que levam ao reconhecimento e à eliminação dos tubos incompatíveis ainda não estão claros (HARING *et al.*, 1990; DE NETTANCOURT, 2000). Um gradiente de Ca^{+2} também está associado à reação de AI (WHEELER *et al.*, 1999).

2.6.2 - Autoincompatibilidade homomórfica esporofítica (AIE)

Neste sistema de autoincompatibilidade, a especificidade do pólen é determinada pelo genótipo diploide do esporófito, isto é, do genitor materno do grão de pólen. Portanto, o que determinará a ocorrência ou não de autoincompatibilidade não será o alelo que o pólen carrega, mas sim os alelos presentes no tecido diplóide da planta (SHIFINO-WITTMANN & DALL'AGNOL, 2002). Assim como no sistema homomórfico gametofítico (AIG), o controle genético da incompatibilidade em plantas com AIE é exercido por apenas um locus S, com alelismo múltiplo em uma população e as hibridações resultam em autoincompatibilidade total ou compatibilidade total, não existindo cruzamentos semicompatíveis (RICHARDS, 1997).

2.6.3 - Autoincompatibilidade heteromórfica (AIH)

Este sistema de autoincompatibilidade está frequentemente associado à heterostilia, a qual se caracteriza pelas flores apresentarem diferenças quanto ao comprimento dos estames. Assim, na distília, os indivíduos de uma população estão divididos em dois grupos, conforme apresentem flores com estilete longo ou curto. Na tristília os indivíduos de uma população são enquadrados em três diferentes grupos, uma vez que suas flores podem apresentar três diferentes comprimentos do estilete (RICHARDS, 1986).

A heterostilia é interpretada como um mecanismo que reduz a geitonogamia (polinização entre flores de um mesmo indivíduo),

interferência sexual e desperdício de pólen em plantas zoófilas (WEBB & LLOYD, 1986), além de promover a transferência mais precisa de pólen entre formas florais (BARRETT, 2002). Espécies heterostílicas muito frequentemente apresentam autoincompatibilidade entre flores de um mesmo indivíduo e entre formas florais semelhantes (BARRETT & CRUZAN, 1994). O dimorfismo floral, associado aos mecanismos de autoincompatibilidade, potencializaria os níveis de polinização cruzada entre formas florais, em espécies heterostílicas (CHARLESWORTH, 1979). Devido à associação entre heterostilia e a AIH, este sistema é mais facilmente reconhecido na natureza.

2.6.4 - Autoincompatibilidade críptica (AIC)

Este tipo de autoincompatibilidade ocorre quando é observada competição de pólen, ou seja, a presença simultânea do auto e alo-pólen, no mesmo estigma/estilete, e resulta na produção de elevado número de sementes provenientes do alo-pólen em detrimento do auto-pólen (BATEMAN, 1956).

A autoincompatibilidade críptica geralmente ocorre no estágio de alongamento do tubo polínico, no estilete, ocasionando um desenvolvimento mais rápido dos tubos polínicos provenientes do alo-pólen (BATEMAN, 1956). No entanto, acrescenta o autor, quando as flores são autopolinizadas, na ausência da competição com o alo-pólen, as plantas que apresentam AIC tem sucesso na fertilização e formação de sementes.

2.6.5 - Autoincompatibilidade de ação tardia (AIT)

Neste tipo de autoincompatibilidade os tubos polínicos penetram nos óvulos autopolinizados, mas estes não formam sementes. Este tipo de autoincompatibilidade é também chamado autoincompatibilidade ovariana (AIO) e foi observada pela primeira vez por Crowe (1971), em *Borago officinalis* L. (Boraginaceae). Seavey e Bawa (1986) comprovaram a existência de barreiras do sistema de incompatibilidade operando no ovário de muitas espécies vegetais e denominaram este sistema de autoincompatibilidade de ação tardia (AIT). Segundo estes autores, existem quatro diferentes categorias de AIT: i) quando a inibição dos tubos polínicos incompatíveis processa-se no ovário, porém antes dos mesmos alcançarem os óvulos; ii) quando a inibição dos tubos incompatíveis tem lugar após a penetração dos óvulos, mas sem que ocorra a singamia; iii) quando a rejeição dos tubos polínicos

incompatíveis processa-se após a formação do zigoto; iv) quando se sabe que a reação de auto-incompatibilidade é ovariana, mas se desconhece os detalhes histológicos do processo de rejeição.

Stephenson *et al.* (2003) sugeriram que a plasticidade dos sistemas de AI é visto como um mecanismo que promove a fecundação cruzada, flexibilizando a intensidade com a qual impede o desenvolvimento do auto-pólen.

2.7 – POLINIZAÇÃO CRUZADA

A polinização ocorre com a chegada do pólen ao estigma das flores, a qual pode ocorrer por contato direto da antera com o estigma, ou por agentes polinizadores, como o vento (anemofilia), a água (hidrofilia), aves (ornitofilia) e insetos (entomofilia) (JOHRI *et al.*, 2001). Esta última é a forma mais comum em fruteiras, realizada, principalmente, por abelhas (RODRIGO & HERRERO, 2000).

No estigma, os grãos de pólen encontram um substrato adequado para a germinação (JOHRI *et al.*, 2001). Após a hidratação, ocorre a germinação do grão de pólen. O tubo polínico cresce através do estigma em direção ao tecido transmissor do estilete e é dependente destas estruturas. Estas estruturas produzem secreções que tem função de guiar e nutrir os tubos polínicos durante o seu trajeto até o ovário (RODRIGO & HERRERO, 2000). Quando chega ao ovário, o tubo polínico encontra o óvulo e entra pela micrópila, penetrando no nucelo e atingindo o saco embrionário (HERRERO, 2003).

2.8 – AUTOINCOMPATIBILIDADE EM *C. XANTHOCARPA*

Estudos com espécies de *Campomanesia* (não incluindo *C. xanthocarpa*) mostraram presença de autoincompatibilidade. *Campomanesia velutina* apresentou evidências de mecanismos de autoincompatibilidade de ação tardia (AIT), sendo que as plantas com fecundação cruzada alcançaram uma produção de frutos de cerca de 75%, enquanto, nas plantas auto-polinizadas, a produção não passou de 7% (PROENÇA & GIBBS, 1994). Almeida *et al.* (2000), trabalhando com outras espécies do gênero, constataram a importância da presença das abelhas (*Apis mellifera*) para a produção de frutos, indicando a necessidade da polinização cruzada e a presença de possível mecanismo de autoincompatibilidade.

Bruckner *et al.* (2005) referem a inexistência de trabalhos abordando a ocorrência de autoincompatibilidade em *C. xanthocarpa*, e

salientam que este aspecto é de extrema relevância para a melhor compreensão da biologia reprodutiva e viabilização da produção comercial da espécie. Os autores complementam que a presença de autoincompatibilidade, em espécies frutíferas cultivadas, implica na constituição dos pomares, onde as cultivares devem conter suficiente diversidade genética para que exista maior eficiência na polinização, e consequentemente, seja obtida elevada produção de frutos .

2.9 – BIODIVERSIDADE

Diversidade biológica refere-se à variedade de vida no planeta Terra, incluindo: a variedade genética dentro das populações e espécies da flora, fauna, e dos microrganismos; a variedade de interações e funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas; a variedade de comunidades, habitats e ecossistemas formados pelos organismos (DIAS, 1996). Para os propósitos da Convenção sobre Biodiversidade Biológica (UNCED, 1992) “diversidade biológica significa a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas”.

2.10 – DOMESTICAÇÃO DE PLANTAS

A domesticação das plantas tem um relacionamento direto de interação com o homem, pois é um processo que envolve mudanças mútuas entre os dois grupos e foi decisiva na mudança do comportamento humano, sendo considerado um pré-requisito para o surgimento das civilizações (SERENO *et al.*, 2008). Pode ser conceituada como “um processo de seleção genética que, por alterar traços chaves, transforma formas silvestres em variedades domesticadas” (SALAMINI *et al.*, 2002). É um processo de modificação do genótipo de maneira contínua, evolutiva, efetuado inconscientemente pelo homem (EVANS, 1993).

Ainda segundo Evans (1993), a síndrome da domesticação pode ser definida como o resultado do processo de domesticação das plantas, resultando em modificações das características originais. As principais características envolvidas são: a supressão de mecanismos de dispersão das sementes; mudanças de forma e condensação, formando estruturas mais compactas; germinação mais rápida e eficiente das sementes;

sincronismo no florescimento e na maturação; perda de substâncias amargas e tóxicas; gigantismo de órgãos; ciclo de vida perene, que se torna anual; e a troca da fecundação cruzada pela autofecundação.

2.11 – CULTIVO DE PLANTAS

O cultivo das plantas é considerado “o hábito de desenvolver plantas para o próprio uso” ou “o particular e persistente interesse por uma cultura, implicando em maior desenvolvimento humano” (EVANS, 1993). Os termos, domesticação e cultivo, não são sinônimos, pois a domesticação envolve mudanças na resposta genética, enquanto o cultivo relaciona-se com a atividade humana de plantio e colheita, tanto na forma silvestre quanto na domesticada (SALAMINI *et al.*, 2002).

2.12 – CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS

Os recursos genéticos são definidos como “espécies de plantas, animais e microrganismos de valor atual ou potencial”. Constituem-se na parte essencial da biodiversidade, que é usada pelo homem para a promoção do desenvolvimento sustentável da agricultura e produção de alimentos (GOEDERT, 2007). O artigo 2º da Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB (UNCED, 1992) define duas estratégias para a conservação dos recursos genéticos: *ex situ* e *in situ*. A conservação *ex situ* que adotaria diferentes técnicas de conservação dos componentes da diversidade biológica fora de seus habitats naturais e a conservação *in situ*, que significa a conservação dos ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus ambientes naturais e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, nos ambientes onde elas desenvolveram suas propriedades distintas. Nenhuma estratégia sozinha pode responder pela adequada conservação e, como ambas são complementares, devem ser utilizadas em conjunto para o sucesso da conservação.

3 – OBJETIVOS DA TESE

3.1 - OBJETIVO GERAL

O projeto de tese teve como objetivo geral elucidar aspectos do desenvolvimento estrutural associado à biologia reprodutiva de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae).

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Acompanhar o desenvolvimento estrutural dos botões florais.
- ✓ Aprofundar os conhecimentos anatômicos acerca da estrutura das partes florais.
- ✓ Elucidar os aspectos estruturais da fecundação cruzada e de um possível mecanismo de autoincompatibilidade atuante.
- ✓ Acompanhar o desenvolvimento de frutos, sementes e embriões a partir da fecundação cruzada controlada.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. J. O. de F., NAVES, R. V., XIMENES, P. A. Influência das abelhas (*Apis mellifera*) na polinização da gabioba (*Campomanesia* spp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, **30** (2): 25-28, jul/dez. 2000.

ALMEIDA, F.J. **Marketing de Sementes. Curso de Tecnologia de Sementes**. Módulo 10. UFPEL\ABEAS. Brasília, D.F. 1998.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121. 2009.

BARRETT, S. C. H. The evolution maintenance, and loss of self-incompatibility systems. In. DOUST J. L. e DOUST, L. L. (eds), **Plant reproductive ecology: patterns and strategies**. p.98–124. Oxford University Press, Oxford 2002.

BARRETT, S. C. H.; CRUZAN, M. B. Incompatibility in heterostylous plants. In. **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants** (WILLIAMS, E. G., CLARKE, A. E. e KNOX, R. B. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 189-219. 1994.

BARROSO, G.M. & PERON, M.V. Myrtaceae- Pp. 261-302. In: M.P.M. LIMA & R.R.G. BRUNI (orgs.). Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo: RJ. Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares. **Jardim Botânico v.1**. Rio de Janeiro. 1994.

BATEMAN, A. J. Cryptic self-incompatibility in the wallflower: *Cheiranthus cheiri* L. **Heredity**. v.10, p.257-261, 1956.

BECK, C.B. **An introduction to plant structure and development**. Cambridge University Press. New York. United States of America. 2009.

BELTRATI, C.M. & PAOLI, A.A.S. Sementes. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, UFV. 2003.

BITTENCOURT JR, N. S. Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em Bignoniaceae. **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia. Campinas, SP, 2003, 286p.

BREWBAKER, J. L. Biology of the angiosperm pollen grains. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, v.19, p.121-33, 1959.

BRUCKNER C. H.; SUASSUNA, T. M. F.; RÊGO, M. M. do; NUNES E. S. Autoincompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. A model for the evolution of distyly. **The American Naturalist**, v.114, n.4, p. 467- 498, 1979.

COCUCCI, A.E.; MARIATH, J.E.A. Sexualidade das plantas. **Ciência Hoje**, v.18, n.106. 1995.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. V.III. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984.

CROWE, L. K. The polygenic control of outbreeding in *Borago officinalis*. **Heredity**, v.27, p.111 - 118, 1971.

CUTLER, D.F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D.W. **Plant Anatomy – An applied approach**. Blackwell Publishing. 2007.

DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. Berlin : Springer, 2000. 320p.

DIAS, B. F. S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. In: **Workshop – Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**. Campinas, 29 de abril a 1º de maio de 1996. 10p.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Ed. Edgard Blücher. São Paulo - SP. 1976.

EVANS, L. T. The domestication of crop plants. In: EVANS, L. T. **Crop evolution adaptation and yield**. Cambridge: Cambridge University Press. p. 62-112. 1993.

FORZZA, R.C. ET AL. (Edt.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Volume 2. 2010.

GIBBS, P. E. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista Brasileira de Botânica**, v.13, p.125-136, 1990.

GIBBS, P.E.; BIANCHI, M.B. Does Late-acting self-incompatibility (LSI) Show family Clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany**, v. 84, p.449-457, 1999.

GOGOZS, A.M.; COSMO, N.L.; BONA, C.; SOUZA, L.A. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). **Acta Botânica Brasileira**. 24(3). 2010.

HARING, V., GRAY, J.E., McCLURE, A., *et al.* Selfincompatibility: a self-recognition system in plants. **Science**, v.250, p.937-941, 1990.

HERRERO, M. Male and female synchrony and regulation of mating in flowering plants. **Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences**, London, v. 358, 2003.

JOHRI, B.M., SRIVASTAVA, P.S., SINGH, N. Reproductive biology of angiosperms. In: JOHRI, B.M., SRIVASTAVA, P.S. **Reproductive Biology of Plants**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2001.

KLAFKE, J.Z. Efeitos da *Campomanesia xanthocarpa* em parâmetros bioquímicos, hematológicos e de estresse oxidativo em pacientes hipercolesterolêmicos. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica)**. Santa Maria/RS. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 2009.

KLEIN, R.M. A importância sociológica das mirtáceas nas florestas rio-grandenses. Pp. 367-375. In: **Anais do 24º Congresso Nacional De Botânica. Sociedade Botânica do Brasil**. Porto Alegre.1984.

LEITÃO FILHO, H.F. **Ecologia da Mata Atlântica de Cubatão (São Paulo)**. Editora da Universidade Estadual de São Paulo, Campinas. 1993.

LEITE, L.L.; CORADIN, L. In: **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região sul**. Brasília: MMA. 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Ed. Plantarum. Nova Odessa/SP. 368 p. 1992.

MAIA, G.N. A relação entre o ser humano e a natureza: reflexo do nosso pensamento. **Tópicos atuais em Botânica – Palestras: 51º Congresso Nacional de Botânica – SBB**. Brasília. D.F. p. 263-267. 2000.

MARCHIORI, J.N.C. & SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: Myrtales**. Ed. Da UFSM. Santa Maria: 304 p. 1997.

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR. N. S. Flor. In. **Anatomia vegetal**. Ed. APEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GURREIRO, S. M.; Viçosa, UFV, 437p. 2006.

MORI, S.A.; BOOM, B.M.; CARVALHO, A.M. & SANTOS, T.S. Ecological Importance of Myrtaceae in an Eastern Brazilian Wet Forest. **Biotropica** 15: 68-70. 1983.

NEWBIGIN, E., ANDERSON, M.A., CLARKE, A. E. Gametophytic self-incompatibility systems. **The Plant Cell**, v.5, p.1315-1324, 1993.

PROENÇA, C., GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from central Brazil. **New Phytologist**, v.126, p. 343-354, 1994.

RICHARDS, A. J. **Plant Breeding Systems**. George Allen & Unwin (Publishers) Ltd, London, UK. 1986, 528p.

RICHARDS, A. J. **Plant Breeding Systems**. Second Edition, Chapman & Hall, USA, 1997, 529p.

RIDGEN, L. V.; CAVALCANTI, T.B.A. A conservação e utilização de recursos genéticos vegetais. In: BENSUSAN, N. (ORG). **Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade: como, para que, por quê**. Brasília: Editora UnB. 2002.

RIZZINI, C.T. & MORS, W.B. **Botânica econômica brasileira**. 2ª ed. Âmbito Cultural Edições Ltda. Rio de Janeiro. 248 p. 1995.

RODRIGO, J., HERRERO, M. **Cuajados erráticos en albaricoquero. Polinizacion y calidad de flor**. Zaragoza: institucion Fernando el Católico. 2000.

SALAMINI, F., OZKAN, H., BRANDOLINI, A., SCHAFER-PREGI, R., MARTIN, W. Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. **Nature Reviews**, New York, v. 3, n. 6, p. 429-441. 2002.

SANTOS, C.M.R. Myrtaceae: análises morfológicas e do efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de espécies nativas do Rio Grande do Sul. **Dissertação (Mestrado em Botânica)**. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 2003.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em Plantas, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.1083-1090, 2002.

SEAVEY. S.R.; BAWA, K.S. Late-Acting Self-Incompatibility in Angiosperms. **The Botanical Review**. v.52, p.195-219, 1986.

SERENO, M. J. C. de M., WIETHOLTER, P., TERRA, T. F. Domesticação das plantas a síndrome que deu certo. In: BERBIERI, R. L., STUMPF, E. R. T. (ed.) **Origem e evolução das plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 37-58. 2008.

SOARES-SILVA, L.H. A Família Myrtaceae - Subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.

SÓLIS, S.M. Estudios morfológicos y anatómicos em hojas com domacios de *Campomanesia guaviroba* (DC) Kiaersk. **Universidad Nacional Del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.** 2000.

SOUZA, M.A.D. de. Biologia reprodutiva de onze espécies de Myrtaceae em floresta de terra firme na Amazônia Central. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)**, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM. 1996.

STEPHENSON, A. G.; TRAVERS, S. E.; MENA-ALI, J. I.; WINSOR, J. A. Pollen performance before and during the autotrophic-heterotrophic transition of pollen tube growth. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.358, p.1009-1018, 2003.

UNCED. **Biodiversity convention.** Geneva: United Nations, 1992.

VALLILO, M.I.; MORENO, P.R.H.; OLIVEIRA, E. de; LAMARDO, L.C.A.; GARBELOTTI, M.L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae). **Ciência Tecnologia Alimentos**. v. 28. Sppl.0. Campinas. SP. 2008.

WEBB, C. J.; LLOYD, D. G. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. **New Zealand Journal of Botany**. v.24, p.63-178, 1986.

WHEELER, M.J., ALLAN, A. C., JORDAN, N.D., *et al.* The intracellular events triggered by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. **Protoplasma**, v.208, p.99-106, 1999.

WILSON, P. G., O'BRIEN, M. M., HESLEWOOD, M. M., QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, 251: 3-19. 2005.

SEÇÃO I

DESENVOLVIMENTO DO PERIANTO, DO ANDROCEU E DO GINECEU DE *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (MYRTACEAE)

CRISTINA MAGALHÃES RIBAS DOS SANTOS

LISTA DE QUADROS – SEÇÃO I

Quadro 1 - Estádios de desenvolvimento das flores de <i>C. xanthocarpa</i> (Adaptado de Ducroquet & Hickel, 1991)	56
Quadro 2 - Etapas da androsporogênese e da androgametogênese, segundo os critérios de Rodrigues <i>et al.</i> (2007)	57

LISTA DE FIGURAS – SEÇÃO I

Figura 1 - Metodologias utilizadas para as análises dos botões florais de <i>C. xanthocarpa</i>	59
Figura 2 - Período de desenvolvimento dos botões florais de <i>C. xanthocarpa</i>	64
Figura 3 - Estádios de desenvolvimento do perianto de <i>C. xanthocarpa</i>	65
Figura 4 - Relação entre os estádios de desenvolvimento do perianto, do androceu e gineceu de <i>C. xanthocarpa</i>	66
Figura 5 - Estádios de desenvolvimento do androceu de <i>C. xanthocarpa</i>	69
Figura 6 - Relação entre os estádios de desenvolvimento das anteras e dos andrófitos de <i>C. xanthocarpa</i>	72
Figura 7 - Relação entre os estádios de desenvolvimento dos botões florais e do gineceu de <i>C. xanthocarpa</i>	75
Figura 8 - Relação entre os estádios de desenvolvimento dos botões florais e dos rudimentos seminais de <i>C. xanthocarpa</i>	78

RESUMO

Botões florais de *Campomanesia xanthocarpa* foram analisados até a fase de antese. Foram realizadas análises estruturais no perianto, androceu e gineceu, acompanhando o processo de maturação do andrófito, ovário e rudimentos seminais. Seis estádios de desenvolvimento – B, C, D1, D2, E e F – foram caracterizados. Os botões florais, nesta espécie, levam cerca de 18 dias a partir do estágio B até a completa abertura da flor. O acompanhamento da androsporangênese e androgametogênese revela a presença de tétrades, andrósporos e andrófitos. No estágio D1, os andrófitos já estão aptos à desenvolver os tubos polínicos e os rudimentos seminais intensificam a diferenciação das estruturas de proteção e esporogênicas. Entretanto, o saco embrionário só completa sua constituição no estágio E (fase balão). O detalhamento de como se desenvolvem os órgãos reprodutivos, os estádios de desenvolvimento dos grãos de pólen e dos rudimentos seminais, relacionados ao tamanho dos botões florais, são de grande relevância para embasar os programas de melhoramento e conservação desta espécie subutilizada, mas com grande potencial agrícola, nutricional e medicinal.

INTRODUÇÃO

Campomanesia xanthocarpa é considerada uma das “plantas para o futuro da região sul do país”, havendo a recomendação do incentivo à pesquisa, especialmente por serem os frutos uma opção promissora no mercado de bebidas artesanais e industriais, além do potencial para produção de polpa concentrada e congelada sendo também considerada espécie medicinal (BIAVATTI *et al.*, 2004; KINUPP, 2007). Há carência de informação sobre plantios comerciais desta espécie, que vem sendo explorada por meio de extrativismo por comunidades locais. A sua conservação depende, exclusivamente, da manutenção de seus *hábitats* naturais (LISBOA *et al.*, 2011).

Para que essa espécie possa entrar em sistemas de produção agrícola, muitos aspectos estruturais de sua biologia reprodutiva precisam ser elucidados. Neste sentido, há poucos trabalhos sobre espécies de *Campomanesia*, sendo a maioria com abordagens sobre as partes vegetativas adultas (SOLÍS, 2000), germinação das sementes e a estrutura das plântulas em desenvolvimento (GOGOSZ, 2008, 2010). Em relação à biologia reprodutiva, em especial aos órgãos reprodutivos, não existem registros mais detalhados na literatura. Por este motivo, o presente trabalho busca aprofundar os estudos caracterizando o desenvolvimento estrutural do perianto, do androceu e do gineceu, uma vez que este conhecimento é de fundamental importância para o manejo, bem como em programas de melhoramento e conservação desta espécie nativa.

1. METODOLOGIA

1.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES:

- Acompanhamento e Coleta de Material Vegetal:

A coleta de ramos florais foi realizada em plantas de áreas remanescentes de mata nativa do Estado de Santa Catarina, no interior do município de Alfredo Wagner, latitude 27°42'01", longitude 49°20'01", altitude 480m, distante 111Km de Florianópolis (capital do estado).

- Análises Laboratoriais:

Foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), do Departamento de Fitotecnia, integrado ao Centro de Ciências Agrárias; no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG) do Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

1.2 – COLETA DOS RAMOS FLORAIS DE *C. XANTHOCARPA*

Foram coletados 6 ramos florais de 1,5m de comprimento, de uma árvore adulta de *C. xanthocarpa* (matriz S1), com botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. O material vegetal foi acondicionado em baldes plásticos contendo água, para transporte e manutenção no laboratório, sendo deixados em ambiente protegido durante 10 dias, seguindo metodologia proposta por Franzon (2008). Para as análises do desenvolvimento morfológico e estrutural (morfohistodiferenciação) foram retirados os botões florais diretamente dos ramos, para identificação dos estádios de desenvolvimento (Tabela 1), conforme os critérios estabelecidos por (DUCROQUET & HICKEL, 1991).

Amostras de material retiradas do indivíduo S1 foram depositadas no herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina, número FLOR 40926 e identificados por Cristina Magalhães Ribas dos Santos.

Quadro 1 - Estádios de desenvolvimento das flores de *C. xanthocarpa* (Adaptado de Ducroquet & Hickel, 1991)

Estádios de desenvolvimento	Critérios morfológicos
B	Botões globosos envoltos por brácteas
C	Primeiro par de sépalas começa a se afastar, mas não aparecem as pétalas. Botões com o dobro de tamanho.
D	Começam a aparecer as pétalas e ocorre maior afastamento das sépalas.
E	Estádio balão. Pétalas descompactadas e prestes a abrir para expor as anteras e o estigma.
F1	Flor com pistilo exposto e afastamento parcial das pétalas.
F2	Flor completamente aberta, com pétalas na posição horizontal, expondo anteras e estigma. Liberação de pólen.

1.3 - ANÁLISE MORFOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO DO PERIANTO, DO ANDROCEU E DO GINECEU DE *C. XANTHOCARPA*

Para estas análises, 200 botões florais, de diferentes tamanhos, foram retirados dos ramos vegetais, aleatoriamente. Os botões florais foram colocados sobre papel milimetrado e analisados sob o microscópio estereoscópio Olympus SZH10 com a unidade de controle DP, Control 71 da Olympus e a câmara fotográfica acoplada. Com base em critérios visuais relativos aos aspectos morfológicos, as amostras foram classificadas nos diferentes estádios de desenvolvimento referidos na Tabela 1. A seguir amostras de botões florais de cada fase foram analisadas para descrição morfológica do androceu e do gineceu. Vinte botões florais foram mantidos nos ramos, no laboratório, sendo marcados com fitas coloridas, para acompanhar os intervalos de tempo (em horas) entre os diferentes estádios.

1.4 – ANÁLISES ESTRUTURAIS DO DESENVOLVIMENTO DO ANDROCEU E DO GINECEU DE *C. XANTHOCARPA*

Para a caracterização estrutural do androceu e do gineceu, nas diferentes fases de desenvolvimento, 20 botões florais de cada estágio

foram analisados por meio de diferentes técnicas, sendo analisados em microscopia óptica e eletrônica de varredura.

Cinco botões florais foram seccionados transversal e longitudinalmente, à mão livre. As secções foram colocadas sobre lâminas histológicas, hidratadas e cobertas por lamínula. Outros cinco botões florais, de cada estágio, foram separados para análise do desenvolvimento dos grãos de pólen. Nestes botões florais, a anteras foram removidas, esmagadas sobre lâmina histológica, coradas com carmim acético 0,5% e cobertas por lamínula. As análises foram realizadas em quatro campos de observação escolhidos de forma aleatória. As categorias relativas à androsporangênese e à androgametogênese (Tabela 2) foram registradas em planilha e imagens, sendo relacionadas aos tamanhos dos botões florais, conforme os critérios de Rodrigues et al. (2007). Estes dois procedimentos foram analisados em microscópio óptico Olympus DP40F, com a unidade de controle DP Control 71 da Olympus e a câmara fotográfica acoplada.

Quadro 2 - Etapas da androsporangênese e da androgametogênese, segundo os critérios de Rodrigues *et al.* (2007)

Etapas	Crítérios
CMM	Células-mãe dos andrósporos ou células arquesporais
Meiócitos	Células em qualquer fase da meiose
Tétrades	Quatro esporos revestidos por calose
Andrósporos	Esporos livres com um núcleo não polarizado
Andrófitos I	Gametófitos com um núcleo polarizado, antes da primeira mitose
Andrófitos II	Gametófitos com duas células, generativa e vegetativa, após a primeira mitose incluindo os diversos estádios de desenvolvimento dos núcleos

Nota: Andrófitos apresentam citoplasma denso, com depósitos de amido, e desenvolvimento completo da exina e da intina.

Outros cinco botões florais de cada estágio foram fixados em glutaraldeído (1%) + formaldeído (4%) (MCDOWELL & TRUMP, 1976), infiltrados com historesina (Leica®), sendo colocados em solução de pré-infiltração (historesina: etanol 95%, 1:1, v/v), durante 24 horas, sob vácuo, e, em seguida, transferidos para a solução de infiltração (historesina pura), por quatro horas, sob vácuo. A seguir, foram colocados em moldes que continham a solução de inclusão

(historesina adicionada de endurecedor). As secções foram feitas em micrótomo de rotação, distendidas em lâminas histológicas e submetidas à coloração com azul de toluidina (O'BRIEN *et al.* 1964). Os registros fotográficos e as análises foram realizados em microscópio óptico Olympus DP40F, com a unidade de controle DP, Control 71 da Olympus e a câmara fotográfica acoplada.

A análise ultraestrutural de superfície, em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em amostras retiradas de cinco botões florais, de cada estágio de desenvolvimento, que haviam sido fixadas em glutaraldeído e desidratadas em série etílica crescente (até álcool 100% PA) para a obtenção das secções transversais e longitudinais. As secções foram colocadas em tubos eppendorfs contendo álcool 100%, por 30 minutos, e, posteriormente, foram submetidas ao ponto crítico de CO₂ Leica EM CPD 030, seguindo procedimento de Horridge & Tamm (1969). Depois da secagem, o material foi aderido sobre suportes de alumínio, com auxílio de uma fita carbono dupla-face e numerado conforme planejamento prévio. Estes suportes foram postos sobre isopor, numa caixa plástica transparente contendo sílica gel. A caixa foi vedada com PVC e colocada dentro de um desumidificador até ser coberto com 20nm de ouro, em metalizador Leica EM CPD 030, modelo CPD 030. A análise e documentação foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

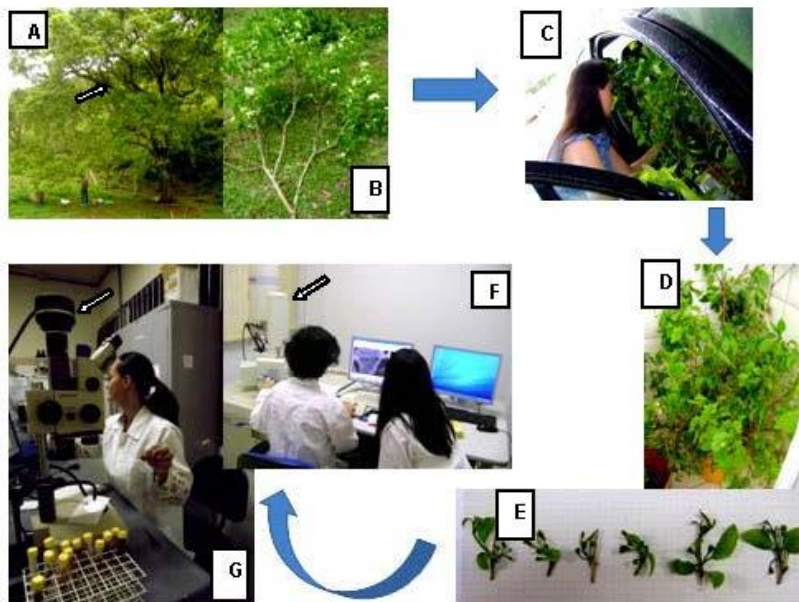


Figura 1 - Metodologias utilizadas para as análises dos botões florais de *C. xanthocarpa* **A)** Indivíduo S1 (seta). **B)** Ramos com botões florais retirados de S1. **C e D)** Transporte e acondicionamento dos ramos florais em baldes contendo água. **E)** Botões florais retirados dos ramos no laboratório. **F)** Microscópio eletrônico de varredura (seta) JEOL JSM-6390LV (LCME/UFSC). **G)** Microscópio estereoscópio Olympus SZH10 (seta) com a unidade de controle DP. Control 71 da Olympus e a câmera fotográfica acoplada (LFDGV/UFSC).

2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 – ANÁLISES MORFOLÓGICAS DO DESENVOLVIMENTO DO PERIANTO, DO ANDROCEU E DO GINECEU DE *C. XANTHOCARPA*

Nesta espécie o perianto, o androceu e o gineceu passaram por modificações de fácil visualização durante o desenvolvimento dos botões florais, com formação de estruturas, tais como os grãos de pólen, ovários e rudimentos seminais, diretamente ligados à formação de frutos e sementes. Para garantir que as estruturas de dispersão (frutos e sementes) e os novos indivíduos (embriões) se formem *C. xanthocarpa* investiu na arquitetura floral. Foram detectados os estádios B, C, D1, D2, E e F de desenvolvimento (Figuras 3A e 4A).

Nos estádios B e C, as estruturas reprodutivas (androceu e gineceu) mostraram-se protegidas pela cápsula floral formada por sépalas e pétalas (perianto) e apresentavam modificações discretas de volume e forma, especialmente do androceu. No estádio B de desenvolvimento, o perianto apresentou um par de brácteas verde claras, na base de um botão floral globoso, com sépalas bem compactadas de cor verde escura (Figura 3B). O androceu mostrou estames com anteras de aspecto translúcido, agrupadas em torno e abaixo do estilete, e com estigma esverdeado (Figura 4B). O estádio C caracterizou-se pela ausência do par de brácteas, apresentando um afastamento do primeiro par de sépalas, sem mostrar as pétalas (Figura 3C). Os estames cobriam parcialmente o estigma e as anteras perderam o aspecto translúcido (Figura 4C).

Em D1 e D2, foram detectadas as maiores mudanças nos botões florais ao longo do desenvolvimento. O pleno desenvolvimento das pétalas começou a ser visualizado a partir do estádio D1, além do androceu e do gineceu mostrarem expressivas diferenças de volume e forma. No estádio D1, foi possível identificar as pétalas devido à coloração branca contrastante com a cor verde das sépalas, estas ligeiramente afastadas (Figura 3D). Assim, estas flores podem ser classificadas como heteroclamídeas, com cálice e corola de colorações diferenciadas. Os estames apresentaram anteras agrupadas ao redor do estilete, na altura das sépalas, permitindo a visualização do estigma (Figura 4D). O estádio D2 mostrou a presença de pétalas bem desenvolvidas, mas ainda dobradas umas sobre as outras, evidentes acima das sépalas (Figura 3E). Nos estames, os filetes exibiram crescimento livre e acima das sépalas, com cerca de 4mm de

comprimento, sustentando as anteras. O estilete e o estigma mostraram-se evidentes acima dos estames (Figura 4E). Até o estágio D2 foi possível perceber indícios de cuidado da espécie com relação às estruturas reprodutivas, tendo em vista que estas se desenvolvem protegidas pelo perianto, cujas partes constituintes foram sendo, gradativamente, flexibilizadas.

No estágio E, o perianto mostrou a presença de pétalas bem desenvolvidas, descompactadas e prestes a se abrir (Figura 3F). Os estames dispuseram-se afastados e ao redor do pistilo exibindo a porção superior do ovário (Figuras 4F e 4G). O estágio F mostrou o perianto formado por cinco pétalas de coloração branca completamente abertas e livres entre si (corola dialipétala) rodeadas por cinco sépalas de cor verde, parcialmente unidas entre si (cálice gamossépalo). Os numerosos estames (flores polistêmones) encontravam-se estendidos, posicionando-se afastados do estigma e do estilete (Figuras 3G e 3H). O estágio E (fase balão) e o estágio F constituíram o período em que *C. xanthocarpa* expôs as estruturas reprodutivas. Nestes estádios a abertura das pétalas e a expansão dos estames, posicionando-se de forma a permitir o acesso ao estigma das flores, são indicativos de facilitação à polinização e às subsequentes cópula e singamia.

Em relação ao tempo de desenvolvimento dos botões florais, nas condições deste experimento, a passagem do estágio B para C levou cerca de setenta e duas horas (3 dias). A transição do estágio C para o D1 foi o período mais prolongado, levando cerca de duzentas e dezesseis horas (9 dias). Considerando as modificações ocorridas no androceu e gineceu, o intervalo D, originalmente estabelecido por Ducroquet e Hickel (1991), neste estudo, foi dividido em D1 e D2, levando, em média, noventa e seis horas (4 dias). A passagem de D2 para E foi de apenas vinte e quatro horas (1 dia). Para passar da fase balão para a completa abertura da flor, o intervalo foi de cerca de oito horas, o que possibilitou a classificação como estágio F. Estes resultados diferiram de Ducroquet & Hickel (1991) que observaram em *Feijoa sellowiana* uma antese gradual, ao longo de dois dias, levando a subdivisão da antese em F1 e F2 (Tabela 1). Os autores definiram F1 como sendo o estágio em que o botão floral estava entreaberto, com emergência do estigma e anteras visíveis; e F2 como sendo o estágio em que o botão floral estava completamente aberto, com as pétalas na posição horizontal. A Figura 2 mostra os intervalos de tempo entre os estádios de desenvolvimento da flor de *C. xanthocarpa*. Os botões florais despenderam 18 ± 2 dias para passarem do estágio B até o F (Figuras 3A e 4A).

Para outras mirtáceas sul americanas, como *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret foram estabelecidos os estádios B, C, D, E, F1 e F2 de desenvolvimento, levando cerca de 30 dias para a completa abertura da flor (STEWART, 1987; DUCROQUET & HICKEL, 1991; FRANZON, 2004). *Eugenia uniflora* L. apresentou os estádios B, C, D, E e F de desenvolvimento, levando cerca de 23 dias para completar este ciclo (FRANZON, 2004). Para *Eugenia involucrata* DC. os estádios B, C, D, E e F se desenvolveram ao longo de 19 dias (DONADIO *et al.*, 2002; FRANZON, 2004). Já *Eugenia pyriformis* Camb. apresentou os estádios B, C, D, E e F de desenvolvimento num período de 46 dias (FRANZON, 2004). Comparativamente *C. xanthocarpa* foi a que apresentou completa abertura da flor num tempo menor, havendo uma maior complexidade de estádios de desenvolvimento entre as fases D1 e D2. Estes dados são importantes quando se pretende trabalhar em programas de melhoramento, pois se sabe o momento ideal de efetuar as polinizações controladas. Além disso, facilita o manejo produtivo da espécie, marcando as fases iniciais de produção potencial de frutos e sementes.

Segundo Bergamaschi (2002), as subdivisões dos estádios de desenvolvimento permitem caracterizar as exigências ecoclimáticas e manejar as espécies quanto à ocorrência de pragas, moléstias e à reprodução com vistas ao melhoramento e à produção. Assim, para *C. xanthocarpa* a subdivisão do estágio D foi de grande relevância, pois em termos de desenvolvimento floral, podemos apontar, como fase mais crítica para estresses de qualquer natureza, o período entre o estágio C e o estágio D2, devido às modificações mais efetivas no androceu e no gineceu.

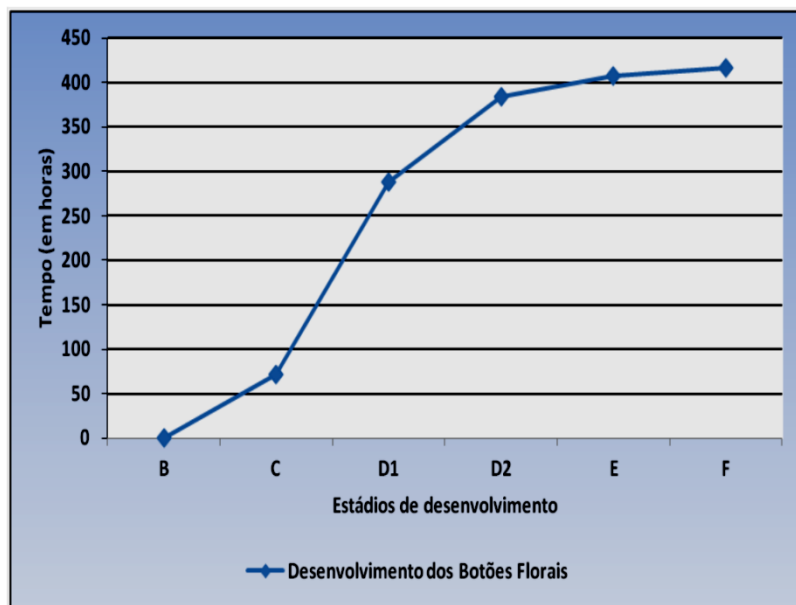


Figura 2 - Período de desenvolvimento dos botões florais de *C. xanthocarpa*: do estágio B para C temos um intervalo de 72 horas. De C para D1, 216 horas. Entre D1 e D2 são 96 horas. Do estágio D2 para E (estádio balão) são 24 horas. De E para a antese (estádio F) passam-se cerca de 8 horas totalizando cerca de, 416 horas para a completa abertura da flor (em média 18 dias).

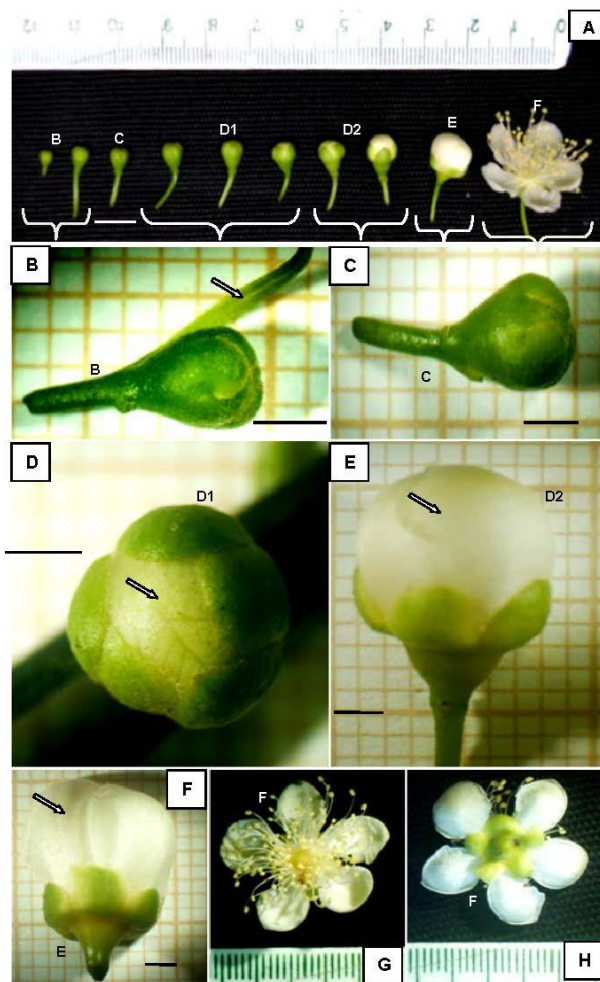


Figura 3 - Estádios de desenvolvimento do perianto de *C. xanthocarpa*.

A) Estádios B, C, D1, D2, E e F; **B)** Botão globoso de coloração verde escura e sépalas bem compactadas. Presença de bráctea verde clara (seta); **C)** Botão floral apresentando afastamento do primeiro par de sépalas, sem aparecerem as pétalas. Par de brácteas ausente; **D)** Pétalas de coloração branca contrastantes com a cor verde das sépalas (seta); **E)** Botões florais com pétalas bem desenvolvidas (seta); **F)** Botão formado por pétalas descompactadas e prestes a se abrir (seta); **G)** Botão floral com 5 pétalas brancas na posição horizontal, expondo os numerosos estames; **H)** Botão floral evidenciando 5 sépalas verdes contrastantes com as pétalas brancas. (Barra = 2mm, exceto em G e H). B, C, D1, D2, E, F = estádios de desenvolvimento.

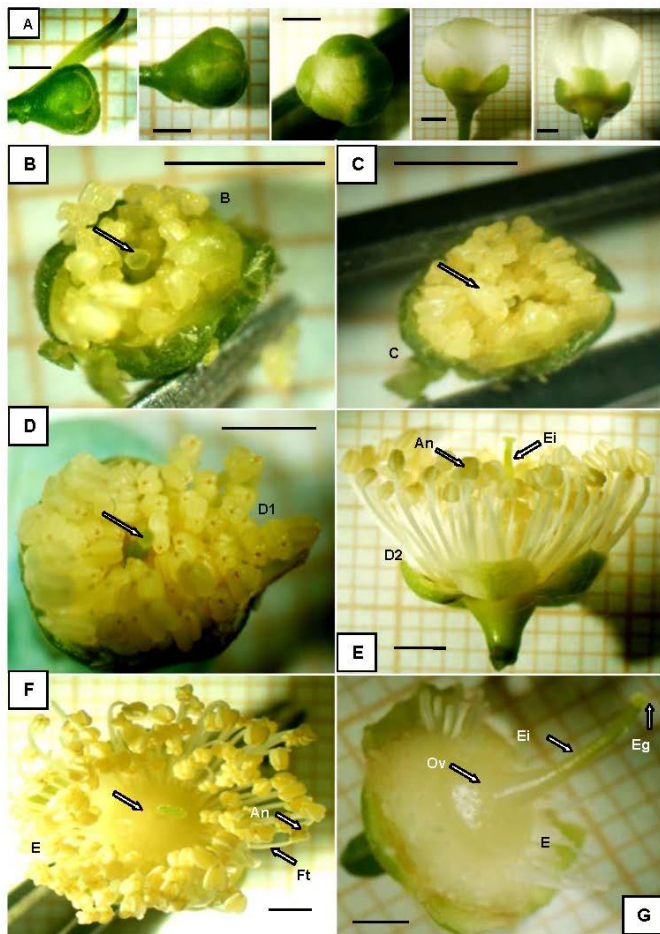


Figura 4 - Relação entre os estádios de desenvolvimento do perianto, do androceu e gineceu de *C. xanthocarpa*. **A)** Estádios B, C, D1, D2 e E de desenvolvimento; **B)** Estames com anteras de aspecto translúcido, agrupados em torno do estilete e do estigma (seta); **C)** Estames cobrindo parcialmente o estigma (seta); **D)** Estames com filetes desenvolvidos sustentando as anteras, agrupados ao redor do estigma bem evidente (seta); **E)** Estames com filetes crescendo livres acima das sépalas, sustentando as anteras que rodeiam o estilete e o estigma; **F)** Androceu com estames formados por filetes alongados e anteras rodeando o estigma e o estilete deixando ver a porção superior do ovário (seta); **G)** Gineceu formado por estigma, estilete e porção superior do ovário. (Barras = 2mm). An = antera, Ft = filete, Eg = estigma, Ei = estilete, Ov = ovário, B, C, D1, D2, E = estádios de desenvolvimento.

2.2 – ANÁLISES ESTRUTURAIS DO DESENVOLVIMENTO DO ANDROCEU E DOS GRÃOS DE PÓLEN DE *C. XANTHOCARPA*

2.2.1 – Desenvolvimento do androceu

Foi possível acompanhar e registrar as etapas de desenvolvimento do androceu relacionadas aos estádios de desenvolvimento dos botões florais (Figura 5A). No estágio B, os estames apresentaram filetes formados por um feixe vascular único, com prolongamento até as anteras, cujos tamanhos eram superiores ao dos filetes. Nas anteras, era evidente o prolongamento do feixe vascular até o conectivo e a separação entre os lóculos (Figura 5B). Secções transversais, no estágio C de desenvolvimento, mostraram anteras tetrasporangidas, constituindo os androsporângios. O conectivo era evidente, na porção central das anteras (Figura 5C). O estágio D1 caracterizou-se pelo aumento do comprimento dos filetes basifixos que sustentavam as anteras próximas às pétalas (Figura 5D). Através de secções transversais nas anteras, o estágio D2 foi caracterizado pelo aumento no tamanho dos androsporângios, além de ter sido possível identificar as células do tapete e do endotécio, o qual não mostrou distinção celular em relação às células da epiderme, indicando a imaturidade da antera. No conectivo, era visível o feixe vascular central (Figura 5E). A fase balão (estádio E) apresentou anteras desenvolvidas, sustentadas pelo filete longo, onde eram evidentes o feixe vascular e o parênquima (Figura 5F). A análise em microscopia eletrônica de varredura revelou que a antera estava constituída por 4 lóculos, com deiscência longitudinal na região do estômio, para liberação dos grãos de pólen (Figura 5G). As análises estruturais do androceu permitiram detectar que do estágio C até o estágio D2 ocorrem as principais modificações nas estruturas formadoras, sendo o período crítico para estresses de qualquer natureza nesta espécie.

O estame é formado por duas partes morfológicamente distintas: a antera e o filamento. O filamento liga o estame à flor e é formado por tecido vascular que transloca água e nutrientes para os tecidos estaminais. A antera contém tecidos reprodutivos e não reprodutivos e é responsável por produzir e liberar os andrófitos para que os processos de polinização e fertilização possam ocorrer na flor (GOLDBERG *et al*, 1993). Segundo Esau (1976), a parede externa da antera é a epiderme e a camada subepidérmica (endotécio) pode apresentar faixas ou arestas de material depositado. A camada mais interna é o tapete, tecido nutritivo constituído de células multinucleadas. Geralmente as anteras sofrem

deiscência e, em muitas espécies, a deiscência é precedida pela destruição da parede divisória entre os lóculos da mesma teca. Mais tarde, o tecido externo desta região também sofre rompimento e o pólen é libertado através da abertura ou estômio. Estudos realizados com a datura (*Datura stramonium*) mostrou que o meristema floral é formado por três "camadas germinativas", designadas L1, L2 e L3 (SATINA *et al.*, 1940) que dão origem a diferentes tecidos das anteras. Assim, uma vez especificadas, o destino de desenvolvimento das camadas L1, L2, L3 e derivados é fixo. Por exemplo, a camada L1 dá origem a epiderme e ao estômio; a camada L2 dá origem às células arquesporais, às células mãe de micrósporos, ao endotécio e às camadas médias que se encontram entre a epiderme e o tapete. A camada L3 dá origem ao tecido conjuntivo, ao feixe vascular e ao agrupamento celular circular adjacente ao estômio (SATINA & BLAKESLEE, 1941).

O desenvolvimento da antera pode ser dividido em duas fases gerais. Durante a fase 1, a morfologia da antera é estabelecida, ocorre a diferenciação das células dos tecidos e as células mãe dos micrósporos sofrem meiose. No final da fase 1, a antera contém a maioria das suas células e tecidos especializados, além das tétrades estarem presentes dentro dos sacos polínicos. Durante a fase 2, os grãos de pólen se diferenciam, a antera aumenta de tamanho e é empurrada para cima pelo crescimento em extensão dos filetes, ocorre degeneração de tecidos com deiscência da antera e liberação do pólen (GOLDBERG *et al.*, 1993). Estas fases foram detectadas neste estudo, pois durante o estágio B de desenvolvimento dos botões florais de *C. xanthocarpa* estava ocorrendo a finalização da fase 1 e o início da fase 2 de desenvolvimento das anteras. Os eventos que conduzem ao desenvolvimento das anteras e à formação e liberação de pólen são rigorosamente programados. A diferenciação celular e a deiscência ocorrem numa ordem cronológica precisa que se correlaciona com o tamanho da gema floral (KOLTUNOW *et al.*, 1990; SCOTT *et al.*, 1991). Estes eventos puderam ser correlacionados neste trabalho, sendo possível estabelecer a conexão entre os estádios de desenvolvimento dos botões florais e as diferentes fases de desenvolvimento das anteras.

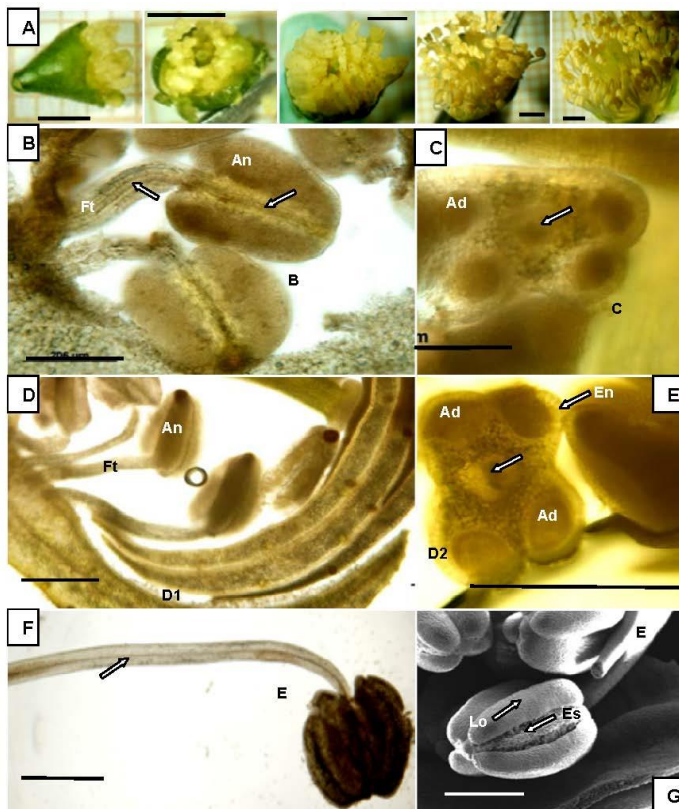


Figura 5 - Estádios de desenvolvimento do androceu de *C. xanthocarpa*. **A)** Estádios B, C, D1, D2 e E de desenvolvimento do androceu; **B)** Estames formados por filetes com feixe vascular central (seta) sustentando anteras com divisão evidente entre os lóculos, mostrando o prolongamento do feixe vascular vindo do filete (seta); **C)** Secção transversal da antera mostrando 4 lóculos (androsporângios). Conectivo na região central da antera (seta); **D)** Filetes e anteras mais longos, denotando aumento de tamanho do androceu (setas); **E)** Secção transversal da antera mostrando androsporângios ocupando um volume maior da antera. Pode-se observar as células do endotécio (células mais alongadas). No conetivo (porção central da antera) evidencia-se o feixe vascular (seta); **F)** Antera bem desenvolvida sustentada por filete delgado e longo. Pode-se visualizar o feixe vascular (seta) e as células do parênquima no filete; **G)** Eletromicrografia de varredura mostrando anteras tetraloculadas, cujas paredes divisórias entre os lóculos formam o estômio. (Barras = 200 μ m em B e C; Barra = 500 μ m em D, E, F e G; Barras = 2mm em A). An = antera, Ft = filete, Ad = androsporângio, En = endotécio, Lo = lóculo, Es = estômio, B, C, D1, D2, E = estádios de desenvolvimento.

2.2.2 – Desenvolvimento dos andrófitos (grãos de pólen)

As análises do material oriundo das anteras de cada estágio de desenvolvimento do androceu (Figura 6A) permitiram acompanhar o desenvolvimento dos andrófitos desde a formação das tétrades, ainda na etapa da androsporogênese (critérios sumarizados na Tabela 2). O estágio B de desenvolvimento apresentou tétrades (andrósporos) (Figura 6B) em início de dissolução da parede calósica para liberação dos andrósporos (Figura 6C). No estágio C de desenvolvimento, verificou-se a passagem da androsporogênese para a androgametogênese, com a liberação dos andrósporos das tétrades. Os andrósporos livres aumentaram de volume, havendo a formação de um grande vacúolo (Figura 6D). Em seguida, as células sofreram mitose assimétrica, originando duas células desiguais, separadas por uma delgada parede pectocelulósica, a célula vegetativa e a célula generativa (Figura 6E). Na continuidade do processo, ocorreu o desaparecimento da vacuolação pré-mitótica e a formação do Andrófito I, com citoplasma denso e esporoderme (Figura 6F). Os estádios D1 e D2 mostraram andrófitos, provavelmente do tipo II, pois já eram funcionais e capazes de emitir o tubo polínico (Figuras 6G e 6H). No estágio balão, os andrófitos II mostraram tubos polínicos bem desenvolvidos (Figuras 6I e 6J). Com a observação em microscopia eletrônica de varredura constatou-se que os andrófitos estavam plenamente formados, tricolpados e isolados, caracterizando-se como mônades, e com a esporoderme finalizada (Figura 6K).

Segundo Mariath *et al.* (2006), durante a androgametogênese, amiloplastos de pequenas dimensões podem estar presentes, dispersos pelo citoplasma, além de surgirem pequenos vacúolos que mais tarde fundem-se e originam um grande vacúolo que polariza o núcleo. Esses autores acrescentam que, em seguida ocorre o desaparecimento da vacuolação pré-mitótica e a formação do Andrófito I, que apresenta citoplasma mais denso e esporoderme espessa, formada pela parede celular de grande complexidade, estratificada em camadas distintas com propriedades físicas e químicas específicas. Erdtman (1952) sugeriu uma terminologia morfológica para a estratificação da esporoderme, a qual, primariamente pode ser dividida em exina e intina. O desenvolvimento de uma parede resistente, envolvendo a futura geração gametofítica masculina (andrófitos), foi de importância fundamental na conquista do ambiente terrestre pelas angiospermas. Sendo transportado pelo vento ou mediante a ação involuntária de vetores animais, o andrófito encontra-se em um meio hostil, onde os riscos de dessecação

são altos. A esporoderme resistente, especializada e estratificada, com substâncias hidrofóbicas provenientes das células do tapete, que se depositam sobre a exina ameniza os danos causados pela desidratação excessiva (MARIATH *et al.*, 2006).

As análises estruturais do desenvolvimento dos andrófitos mostraram que para garantir a produção de material funcional na fecundação, a embriogênese e, em consequência, a formação de frutos e sementes, *C. xanthocarpa* investiu nas estruturas de proteção (perianto) até que a esporoderme estivesse completamente formada (estádio E). Além disso, o detalhamento da esporogênese e da gametogênese é essencial para a identificação de estádios críticos de desenvolvimento dos andrófitos, visando à adoção de técnicas de manejo que previnam a ação dos ventos ou de déficit hídrico, bem como de pragas ou moléstias que poderiam afetar os botões florais entre o estágio C e D2 de desenvolvimento, os quais apresentam estádios transicionais entre a androsporogênese e a androgametogênese (andrósporo, andrófito I e andrófito II).

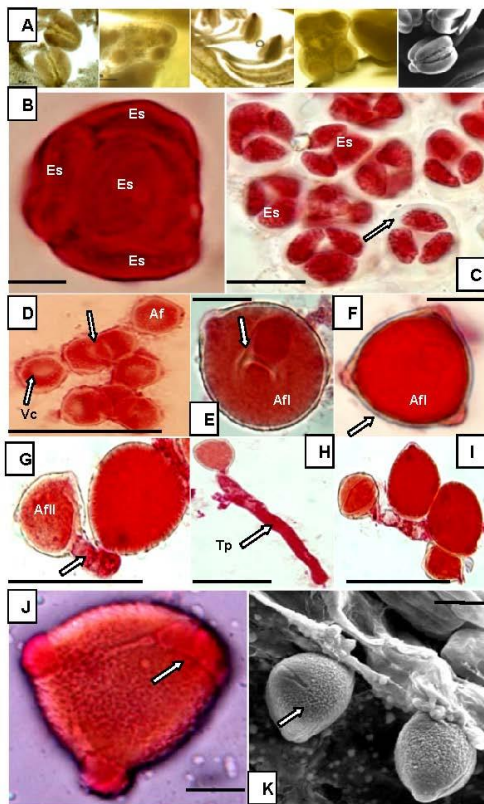


Figura 6 - Relação entre os estádios de desenvolvimento das anteras e dos andrófitos de *C. xanthocarpa*. **A)** Estádios B, C, D1, D2 e E de desenvolvimento das anteras. **B)** Tétrade típica, com quatro esporos (setas); **C)** Início da dissolução da parede calósica (seta) para liberação dos esporos das tétrades (setas brancas); **D)** Liberação dos esporos das tétrades (seta) e início da formação dos andrófitos com vacuolização do citoplasma (seta); **E)** Andrófito I em citocinese pós-mitótica, com separação de duas células desiguais por uma delgada parede (seta); **F)** Andrófito típico, com citoplasma denso e esporoderme espessa (seta); **G)** Andrófito II em fase inicial de emissão do tubo polínico (seta preta); **H e I)** Andrófitos II com tubo polínico bem desenvolvido (seta) e em início de desenvolvimento (em I); **J)** Andrófito II tricolpado com esporoderme plenamente formada (seta); **K)** Eletromicrografia de varredura mostrando Andrófito II (grão de pólen), mônade (seta). (Corante carmim acético, exceto em K). (Barras = 500µm em B, E, F, G, H, I, J; Barra = 200µm em D; Barra = 50µm em C; Barra = 10µm em K). Es = esporo, Af = andrófito, Afl = andrófito I, AflI = andrófito II, Vc = vacúolo, Tp = tubo polínico.

2.3 – ANÁLISES ESTRUTURAIS DO DESENVOLVIMENTO DO GINECEU E DOS RUDIMENTOS SEMINAIS (ÓVULOS) DE *C. XANTHOCARPA*

2.3.1 – Desenvolvimento do gineceu

Com o auxílio da microscopia óptica, foi possível relacionar o desenvolvimento do gineceu ao dos botões florais (Figura 7A). No estágio B, o pistilo encontrava-se rodeado pelos estames, protegido pelas pétalas, dispostas em camadas sobre estas estruturas, as quais estavam envolvidas pelas sépalas. Os verticilos de sépalas, pétalas e estames estavam inseridos de forma que permitiam ver a porção superior do ovário (Figuras 7A e 7B) não sendo possível delimitar com exatidão as estruturas do perianto e do ovário. Na região basal do pistilo, em *C. xanthocarpa*, foi possível visualizar as estruturas secretoras de óleo, subepidérmicas, e uma zona parenquimática com pouca vascularização. As cavidades ovarianas mostraram rudimentos seminais em início de desenvolvimento (Figura 7B).

O estágio C apresentou as estruturas do pistilo mais desenvolvidas e protegidas pelas pétalas e sépalas, sem alcançar a altura das pétalas. Na região ovariana, as estruturas secretoras de óleo mais conspícuas e na zona parenquimática evidenciava-se um aumento da vascularização. Os rudimentos seminais (ovário pluriovulado) mostraram placentação axial, ocupando quase a totalidade dos lóculos ovarianos (Figura 7C).

No estágio D1, a estrutura superior do pistilo (estigma) alcançou a altura das pétalas, sendo que as células da região superior do estilete apresentaram coloração esverdeada, sugerindo a presença de cloroplastos. Toda região do ovário mostrou-se aumentada e os lóculos completamente preenchidos pelos rudimentos seminais, sendo evidente a região placentária axial (Figura 7D). O estágio D2 caracterizou-se pela presença de muitas estruturas secretoras de óleo nas diferentes partes do gineceu, inclusive ao longo do estilete. Na região dos ovários, constatou-se intensa vascularização e estruturas secretoras subepidérmicas bem evidentes. Os lóculos estavam completamente preenchidos pelos rudimentos seminais que exibiam uma região interna bem marcada (Figura 7E).

No estágio F, a região stigma-estilete apresentou pleno desenvolvimento, sendo marcante, na região ovariana, a vascularização periférica e o desenvolvimento do tecido parenquimático, cujas células próximas aos lóculos mostraram coloração mais escura, provavelmente

ligada ao armazenamento de ar. Nos lóculos, a região placentária era evidente sustentando rudimentos seminais em fase final de desenvolvimento, reunidos em fileiras de 5 a 7. Foi possível identificar, nos septos divisórios dos lóculos, um canal oco (Figuras 7F e 7G).

O gineceu, formado por carpelos, consiste em megasporófilos que englobam um ou mais óvulos, enquanto o androceu reúne os estames, que são os microesporófilos (SIMPSON, 2006). Os carpelos consistem no ovário contendo os óvulos que se desenvolvem em sementes e o estilete ou estilo, uma extensão mais fina do ovário que termina no estigma. O estigma é o receptor do pólen e a estrutura sobre a qual o pólen germina (BECK, 2009). Segundo Esau (1976), o estigma é formado por um tecido glandular secretor de substâncias que criam um meio adequado à germinação dos tubos polínicos. As células epidérmicas são comumente alongadas formando papilas ou pelos curtos ou longos e ramificados. Ainda, segundo Esau (1976) o tecido do estigma está ligado ao ovário por um tecido semelhante, denominado tecido estigmatóide. Em estiletos que apresentam um canal, este é revestido pelo tecido estigmatóide. Em estiletos maciços, o tecido estigmatóide forma um mais cordões incluídos no tecido fundamental ou associa-se aos feixes vasculares. Do ponto de vista histológico, ovário e estilete apresentam epiderme, tecido fundamental parenquimático e feixes vasculares na antese. A epiderme externa é cutinizada, podendo apresentar estômatos. Os óvulos são formados pelo nucelo envolvendo o tecido esporógeno, um ou dois tegumentos de origem epidérmica e um pedúnculo denominado funículo. Na antese são formados por parênquima, contendo um sistema vascular. A análise estrutural do gineceu ao longo de seu desenvolvimento possibilitou a constatação de que este mantinha relação estreita com o desenvolvimento do perianto, pois as pétalas e sépalas mantiveram o pistilo protegido até o estágio F de desenvolvimento desta estrutura reprodutiva feminina.

As estruturas secretoras são muito comuns em vários órgãos de *C. xanthocarpa*, sendo analisadas de forma pormenorizada na seção 2. Provavelmente estas estruturas estão envolvidas na proteção dos órgãos onde se desenvolvem o que explica o aumento destas com o desenvolvimento do gineceu. Em relação ao aumento da vascularização ao longo do processo de desenvolvimento do botão floral, acompanhando o aumento em volume do ovário, explica-se pela maior exigência do aporte de água e nutrientes, para o preparo de condições para polinização e fertilização e formação dos rudimentos seminais.

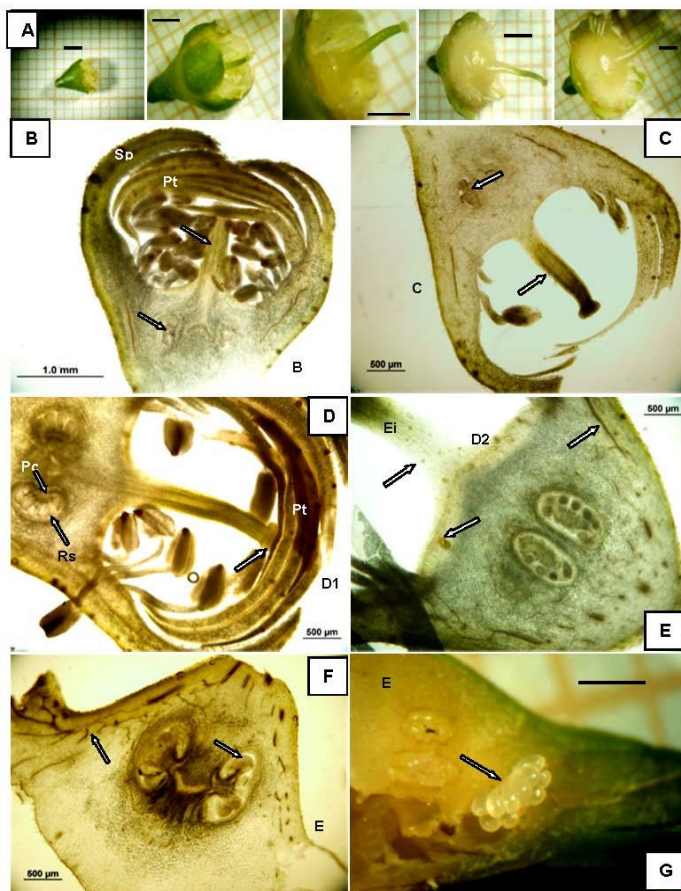


Figura 7 - Relação entre os estádios de desenvolvimento dos botões florais e do gineceu de *C. xanthocarpa*. **A)** Estádios B, C, D1, D2 e E de desenvolvimento; **B)** Estigma e estilete (seta) protegidos pelo perianto. Lóculos ovarianos semi-preenchidos pelos rudimentos seminais (seta); **C)** Estigma, estilete e rudimentos seminais em desenvolvimento (setas); **D)** Estigma alcançando as pétalas (seta) e região ovariana com rudimentos seminais (seta) preenchendo todo o lóculo, presos à placenta (seta); **E)** Região ovariana com tecido parenquimático e feixes vasculares bem desenvolvidos (seta). Estruturas secretoras (setas) na parede do ovário e ao longo do estilete. **F)** Lóculos ovarianos com rudimentos seminais desenvolvidos (seta) e tecidos com intensa vascularização (seta). **G)** Rudimentos seminais reunidos em fileiras (seta). Barra = 2mm (A); Barra = 1mm (G); B, C, D1, D2, E = estádios de desenvolvimento; Pt = pétalas, Sp = sépalas, Pc = placenta, Ei = estilete, Rs = rudimentos seminais.

2.3.2 – Desenvolvimento dos rudimentos seminais (óvulos)

Com o auxílio da microscopia óptica e eletrônica de varredura foi possível relacionar os estádios de desenvolvimento do gineceu ao desenvolvimento dos rudimentos seminais (Figura 8A). O estágio B caracterizou-se pela formação inicial destas estruturas na parede interna ovariana, a partir dos tecidos placentários, sem ocupar a totalidade dos lóculos (Figura 8B). Foi possível identificar regiões coradas mais intensamente com azul de toluidina, indicando intensa atividade mitótica, para a formação das células do nucelo (estrutura em domo) e três camadas na região placentária, estrutura trizonada (Figura 8C). No estágio C, a placenta mostrou-se bem desenvolvida sustentando os rudimentos seminais, que ocupavam quase a totalidade dos lóculos (Figura 8D). No funículo em formação, era possível ver o feixe vascular bem desenvolvido e a região nucelar (Figura 8E). No estágio D1, os rudimentos seminais ocuparam todo o lóculo, sustentados pela placenta, a qual se mostrou como uma excrescência na cavidade ovariana (Figura 8F). Na região calazal, os tegumentos ainda em formação, apareceram envolvendo o nucelo que se desenvolvia a partir da porção apical do rudimento seminal, com formação incipiente do saco embrionário (Figura 8G). No estágio D2, os rudimentos seminais apresentaram uma região escura, bem demarcada quando corada com carmim acético, confirmando atividade mitótica da região nucelar (Figura 8H). Neste estágio de desenvolvimento, no rudimento seminal crassinucleado, as camadas de tecido tegumentar apresentaram-se envolvendo o nucelo massivo e, ainda, constatou-se o início da formação do saco embrionário (Figuras 8I e 8J). Na fase balão, os rudimentos seminais anátropos estavam em fase final de desenvolvimento, apresentando forma típica, sendo sustentados pelo funículo (Figura 8K). Foi possível identificar duas camadas de tecidos tegumentares completamente formados, os quais delimitavam claramente o tecido nucelar e o saco embrionário, interrompendo-se na micrópila, esta delimitada pelo tegumento interno (Figuras 8L e 8M).

Segundo Souza (2009), os rudimentos seminais formam-se na região da placenta, a partir de divisões periclinais que ocorrem nas células epidérmicas, originando uma estrutura em domo que é o nucelo jovem. De Toni & Mariath (2008) afirmam que, com base no padrão de divisão das células, a região da placenta apresenta uma estrutura trizonada, formando uma camada epidérmica, uma subepidérmica e outra central. O desenvolvimento do rudimento seminal inicia com divisões periclinais e anticlinais da camada central. De acordo com

Bouman (1984), provavelmente existe relação entre a estrutura placentária e o tamanho dos rudimentos seminais e sementes, pois estruturas trizonadas formam rudimentos seminais grandes, com funículo e nucelo grandes. Souza (2009) referem-se ao funículo como um pedúnculo de comprimento variável que se desenvolve entre a placenta e o rudimento seminal. Através desta estrutura se processa o suprimento vascular do rudimento seminal. Ainda, de acordo com Souza (2009), rudimentos seminais crassinucleados apresentam nucelo massivo e bem desenvolvido, formado histologicamente por uma epiderme cuticularizada e um tecido parenquimático. São considerados bitegumentados quando apresentam dois tegumentos limitando a micrópila, que por sua vez, é um poro no ápice do tegumento do rudimento seminal, podendo ser delimitada somente pelo tegumento interno. Os rudimentos seminais podem sofrer curvatura durante seu desenvolvimento, em função do maior crescimento em uma de suas faces. Quando o corpo do rudimento seminal curva-se completamente, mantendo a micrópila junto ao hilo ou à calaza, é classificado como anátropo.

Os ginófitos (sacos embrionários) desenvolvem-se no seio de um esporângio (nucelo) que exibe características neotênicas, isto é, adquire maturidade reprodutiva ainda em estado meristemático. Os ginósporos nunca abandonam o esporângio, pois não diferenciam estruturas que permitam sua deiscência. Desenvolvem uma atividade lítica agressiva, aproveitando os tecidos circundantes como fonte nutritiva. Nas angiospermas, complementa o autor, geralmente, o ginospórângio (nucelo) é totalmente consumido pelo ginófito em desenvolvimento e, logo a seguir, pelo embrião esporofítico e pelo xenófito (endosperma) (COCUCCI, 1995).

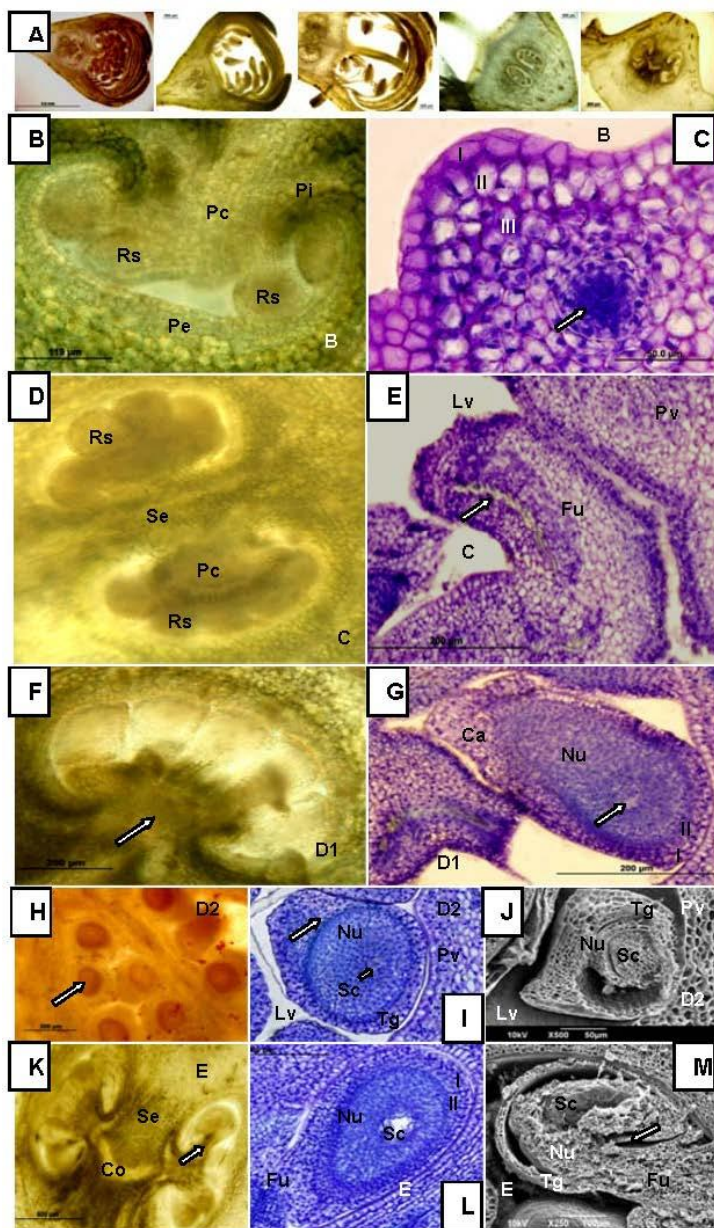


Figura 8 - Relação entre os estádios de desenvolvimento dos botões florais e dos rudimentos seminais de *C. xanthocarpa*.

A) Estádios B, C, D1, D2 e E de desenvolvimento dos ovários; **B)** Rudimentos seminais em início de formação a partir da placenta, originando-se na região da parede interna ovariana; **C)** Surgimento do rudimento seminal trizonado (camadas I, II e III) a partir das divisões periclinais do tecido placentário. Na camada subepidérmica evidencia-se a região de células com alta atividade mitótica (seta); **D)** Região portadora dos rudimentos seminais mais desenvolvidos, com região placentária evidente e lóculos divididos pelo septo; **E)** Funículo em formação, evidenciando o feixe vascular (seta). Detalhe do parênquima e do lóculo ovariano; **F)** Volume máximo do lóculo ocupado pelos rudimentos seminais. Região placentária bem desenvolvida (seta); **G)** Região calazal, com tegumentos (I e II) envolvendo o nucelo e formação inicial do saco embrionário (seta); **H)** Rudimentos seminais intensamente corados com carmim acético (atividade mitótica) (seta). **I, J)** Secção transversal em microscopia óptica e eletrônica de varredura evidenciando nos rudimentos seminais a região nucelar com intensa atividade mitótica (seta em I), os tegumentos, o saco embrionário em formação, o lóculo e o parênquima do ovário; **K)** Ovário com lóculos evidentes delimitados por placenta desenvolvida de onde se originam os funículos (seta) que sustentam os rudimentos seminais em fase final de maturação. Canal oco no septo entre os lóculos; **L, M)** Rudimentos seminais desenvolvidos, unidos à placenta ovariana pelo funículo, nos quais distingue-se a presença dos tegumentos (I, II) que interrompem-se na micrópila (seta em M). Região nucelar com saco embrionário desenvolvido. Barras = 50µm (C, J); Barras = 100µm (B, M, L, I); Barras = 200µm (E, F, D, G, H); Barras = 500µm (K). Pc = placenta, Pi = parede interna ovariana, Pe = parede externa ovariana, Rs = rudimento seminal, Se = septo, Lv = lóculo ovariano, Pv = parênquima ovariano, Fu = funículo, Ca = calaza, Nu = nucelo, Sc = saco embrionário, Tg = tegumento; B, C, D1, D2, E = estádios de desenvolvimento dos ovários.

3- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos associados ao desenvolvimento do perianto, do androceu e do gineceu de *Campomanesia xanthocarpa* permitem concluir que:

1. A etapa de florescimento da espécie dura, em média, 18 dias podendo-se dividir os estádios de desenvolvimento dos botões florais em B, C, D1, D2, E (estádio balão) e F (antese).
2. Podemos considerar como períodos mais críticos as fases C até D2, pois estarão sendo formados os órgãos reprodutivos (androceu e gineceu) que garantem a produção de sementes e frutos.
3. O desenvolvimento dos andrófitos mostra que os mesmos são capazes de emitir o tubo polínico a partir do estágio D1 de desenvolvimento dos botões florais.
4. Em relação ao desenvolvimento dos rudimentos seminiais, a partir do estágio D1 ocorre a intensificação da formação das estruturas de proteção e formação do saco embrionário, embora este se complete somente no estágio E (fase balão).

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECK, C.B. **An introduction to plant structure and development.** Cambridge University Press. New York. United States of America. 2009.

BERGAMASCHI, H. **Fenologia.** 2002. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/agropfagrom/disciplinas/502/agr05502.html>

BIAVATTI, M. W., FARIAS, C., CURTIUS, F., BRASIL, L. M., HORT, S., SCHUSTER, L. S. N., PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, **v.93, n.2-3**, p.385-389. 2004.

BOUMAN, F. The ovule. In: JOHRI, B. M. (Ed.) **Embryology of angiosperms.** Springer Berlin, p. 123–157. 1984.

COCUCCI, A.E.; MARIATH, J.E.A. Sexualidade das plantas. **Ciência Hoje**, **v.18, n.106**. 1995.

DE TONI, K. L. G., MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny of *Chomelia* and *Ixora* (Rubiaceae) **Plant Systematics and Evolution**, **v. 272**: 39–48. Printed in The Netherlands. 2008.

DONADIO, L.C., MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras.** Jaboticabal: Ed. Novos Talentos, 288p. 2002.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R. Fenologia da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana*, Berg) no Alto Vale do Rio do Peixe, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, **v.13, n.3**, p.313-320, 1991.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms.** Stockholm: Almqvist and Wiksell, 1952.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes.** Ed. Edgard Blücher. São Paulo - SP. 1976.

FRANZON, R.C. **Caracterização de mirtáceas nativas do sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2004.

FRANZON, R.C. – Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) – **Tese (Doutorado em Ciências)**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS. 2008.

GOGOSZ, A.M. – Germinação e estrutura das plântulas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (*Myrtaceae*) crescendo em solo contaminado com petróleo e biorremediado - **Dissertação (Mestrado em Botânica)**. Curitiba. Universidade Federal do Paraná. 2008.

GOGOZS, A.M.; COSMO, N.L.; BONA, C.; SOUZA, L.A. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (*Myrtaceae*). **Acta Botânica Brasileira**. **24 (3)**. 2010.

GOLDBERG, R. B., BEALS, T. P., SANDERS, P. M. Anther development: basic principles and practical applications. **The Plant Cell**, v. 5: 1217-1229. American Society of Plant Physiologists. 1993.

HORRIDGE, G.A. & TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science** **163**: 817-818. 1969.

KINUPP, V. F. Plantas alimentícias não convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS. **Tese (Doutorado em Fitotecnia)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 2007.

KOLTUNOW, A.M., TRUETTNER, J., COX, K.H., WALLROTH, M., GOIDBERG, R.B. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. **Plant Cell** **2**: 1201-1224. 1990.

LEITE, L.L.; CORADIN, L. In: **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região sul**. Brasília: MMA. 2011.

LISBOA, G. N., KINUPP, V. F., BARROS, I. B. I. de. *Campomanesia xanthocarpa* (Guabiroba). In: **Espécies nativas da flora brasileira de**

valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul. Ed. CORADIN, L., SIMINSKI, A., REIS, A. Brasília: MMA, 934 p. 2011.

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR. N. S. Flor. In. **Anatomia vegetal.** Ed. APEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GURREIRO, S. M.; Viçosa, UFV, 437p. 2006.

MCDOWELL, E.M. & TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** **100**: 405-414. 1976.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. & MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** **59**: 368-373. 1964.

RODRIGUES, L. R., BEAUVALET, C. S., OLIVEIRA, J. M. S., MARIATH, J. E. A. Etapas da androsporangênese e da androgametogênese da *Pahseolus vulgaris* L. de acordo com o tamanho do botão floral. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1. Porto Alegre. 2007.

SATINA, S. & BLAKESLEE, A.F. Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. **American Journal of Botany**, **5**: 1265-1275. **149**: 155-185. **7**: 974-985. **28**: 862-871. 1941.

SATINA, S., BLAKESLEE, A.F., AVERY, A.G. Demonstration of three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. **American Journal of Botany**, **27**: 895-905. 1940.

SCOTT, R., HODGE, R., PAUL, W., DRAPER, J. The molecular biology of anther differentiation. **Plant Science**, **80**: 167-191. 1991.

SIMPSON, M. G. **Plant Systematics**. Elsevier, Amsterdam. 2006.

SÓLIS, S.M. – Estudos morfológicos y anatómicos em folhas com domácios de *Campomanesia guaviroba* (DC) Kiaersk. – **Universidad Nacional Del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**. 2000.

SOUZA, L. A. (Org.). **Sementes e plântulas – germinação, estrutura e adaptação**. Ponta Grossa: Todapalavra Editora. 2009.

STEWART, A.M.; CRAIG, J.L. Factors affecting pollinator effectiveness in *Feijoa sellowiana*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Auckland, v.17, p.145-154, 1989.

SEÇÃO II

ANÁLISE ESTRUTURAL DAS PARTES FLORAIS DE *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (MYRTACEAE)

CRISTINA MAGALHÃES RIBAS DOS SANTOS

LISTA DE FIGURAS – SEÇÃO II

Figura 1 - Metodologias para análise estrutural das partes florais de <i>C. xanthocarpa</i>	97
Figura 2 - Flor diclamídea, heteroclamídea e polistêmone de <i>C. xanthocarpa</i> em antese, mostrando os estames (Em), o pistilo (Pl), as pétalas (Pt) e as sépalas (Sp).	99
Figura 3 - Cálice de <i>C. xanthocarpa</i>	102
Figura 4 - Corola de <i>C. xanthocarpa</i>	103
Figura 5 - Estames e andrófitos de <i>C. xanthocarpa</i>	107
Figura 6 - Gineceu de <i>C. xanthocarpa</i>	111
Figura 7 - Estilete e ovário de <i>C. xanthocarpa</i>	112
Figura 8 - Glândulas de óleo e tricomas em partes florais de <i>C. xanthocarpa</i>	115

RESUMO

O estudo inclui a análise estrutural das partes florais de *C. xanthocarpa* visando a compreensão das estratégias da espécie para assegurar a continuidade da espécie em ambientes naturais, através da reprodução sexuada. O cálice é formado por cinco sépalas de coloração verde-clara, apresentando estômatos na face abaxial (externa) e tricomas secretores na face adaxial. A corola, constituída por cinco pétalas obovadas de coloração branca, é intensamente vascularizada. As pétalas são hipoestomáticas; na face adaxial, tricomas restringem-se à base e as células epidérmicas têm paredes periclinais externas convexas; um parênquima homogêneo, com glândulas de óleo subepidérmicas, compõe o mesofilo. O gineceu apresenta o estigma capitado-peltado, com uma ruptura central, do tipo seco, com as células epidérmicas papilosas. O estilete é formado pelo canal estilar oco, revestido por tecido estigmático, que se estende até as cavidades ovarianas. O ovário é ínfero, possui de seis a oito lóculos, com rudimentos seminais bisseriados. O mesofilo ovariano é formado por tecido parenquimático, o qual mostra conspícuos espaços intercelulares (reserva de ar) e glândulas de óleo subepidérmicas. Os feixes vasculares são abundantes e a epiderme é fortemente cutinizada e recoberta por tricomas. O androceu é formado por estames com filetes alongados que sustentam as anteras tetraloculadas, onde se formam os andrófitos. Os quatro microesporângios constituem as duas tecas unidas por um conetivo com o feixe vascular central. A deiscência ocorre a partir do estômio. Histologicamente, as anteras são constituídas por uma epiderme, endotécio e tapete (parietal e invasivo). Com a maturação dos androsporângios (sacos polínicos) evidenciaram-se células desintegradas do tapete, invasivas entre os andrósporos. Esta espécie apresenta glândulas secretoras esquizolisígenas, ricas em lipídios e fenóis, abundantes em praticamente todos os órgãos reprodutivos analisados, além de tricomas secretores unicelulares que mostraram reação positiva ao Sudan III, especialmente na base, indicando a presença de compostos lipídicos. O detalhamento das partes florais permite o enriquecimento do material bibliográfico disponível, com detalhes estruturais importantes que podem servir para embasar os programas de domesticação, melhoramento e conservação desta espécie promissora subutilizada e negligenciada.

INTRODUÇÃO

A reprodução sexuada nas Magnoliophyta, especialmente no grupo das Magnoliopsida (Dycotyledoneae) é realizada pela flor que é considerada um ramo transformado, formada por um eixo caulinar e folhas diversamente modificadas, estéreis e férteis (SOUZA, 2003). As partes florais são altamente especializadas e evoluíram com funções específicas. Evidências fósseis indicam que evoluíram a partir das folhas de antepassados e a principal evidência é a forma e a venação das pétalas e sépalas e, em menor grau dos estames e dos carpelos (BECK, 2010).

Segundo Simpson (2006), os botões florais estão constituídos por perianto, gineceu e androceu. O perianto é a parte mais externa, constituído por sépalas e pétalas. O gineceu é constituído por estigma, estilo e ovário, neste formam-se os rudimentos seminais. O androceu está formado por estames constituídos de filete e antera. O gineceu, formado por carpelos, consiste em megasporófilos que englobam um ou mais óvulos, enquanto o androceu reúne os estames, que são os microesporófilos.

Campomanesia xanthocarpa foi classificada dentro da Subfamília Myrtoideae definida por flores bissexuadas, óvulos com saco embrionário monospórico e número cromossômico básico $x = 11$ (WILSON *et al.*, 2005). Dentro desta subfamília, acrescentam os autores, temos a tribo Myrteae, que compreende todas as Myrtaceae americanas. Sanchotene (1989) descreve as flores de *C. xanthocarpa* como de coloração brancas, hermafroditas, zigomorfas, partindo de pedúnculos unifloros, com 1 a 3 cm de comprimento, solitários ou em grupos, situados sobre ramos do ano. O cálice é formado por 5 sépalas, levemente pubescentes. A corola é constituída por 5 pétalas obovadas. Os estames são numerosos, com cerca de 8 mm de comprimento. O ovário é ínfero, podendo conter até 16 lóculos, bisseriados. O estilo mede 5 mm de altura, com estigma capitado ou peltado. O receptáculo floral é plano e glabro.

Lima *et al.* (2011) referem-se a flores formadas por pedúnculos de 0,7 a 3,5 cm comprimento, unifloros; bractéolas lineares, caducas antes da antese. Flores com hipanto coberto por tricomas, raro glabro; cálice aberto no botão, com lobos 0,7 a 1,8 vezes mais compridos do que largos, tricomas presentes internamente ou nas margens, glândulas presentes externamente; pétalas glabras ou com tricomas nas margens, glândulas presentes externamente; estames em número de 80 a 150 com

glândula apical ausente; ovário 5 a 10 locular; estilete com 3 a 7 mm comprimento.

Não existem registros de trabalhos mais aprofundados acerca da caracterização das estruturas formadoras da flor em *Campomanesia xanthocarpa*. Além disso, as análises estruturais do perianto (cálice e corola), do androceu e do gineceu são relevantes para entender quais as estratégias que a espécie utiliza buscando assegurar sua reprodução, a perpetuação nos ambientes onde ocorre e a conquista de novos ambientes. Além disso, assegura o aporte de informações importantes para o melhoramento, a domesticação e a conservação desta espécie nativa do sul do Brasil. Por estes motivos, o presente trabalho teve por objetivo geral analisar estruturalmente as partes florais de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae) visando compreender as estratégias que asseguram a reprodução sexuada.

1. METODOLOGIA

1.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES

- Coleta de Material Vegetal:

A coleta de ramos com botões florais, foi realizada em plantas de área remanescente de mata nativa do Estado de Santa Catarina, no interior do município de Alfredo Wagner, latitude 27°42'01", longitude 49°20'01", altitude 480m, distante 111Km de Florianópolis (capital do estado).

- Análises Laboratoriais:

Foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), do Departamento de Fitotecnia, integrado ao Centro de Ciências Agrárias, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG) do Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

1.2 – COLETA DOS RAMOS FLORAIS DE *C. XANTHOCARPA*

Foram coletados ramos florais de 1,5m de comprimento, de árvores adultas de *C. xanthocarpa*, com botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. O material vegetal foi acondicionado em baldes plásticos contendo água, para transporte e manutenção no laboratório (adaptado de FRANZON, 2008). Para as análises estruturais das partes florais, foram coletados 50 botões florais no estágio E (fase balão) diretamente dos ramos.

1.3 - ANÁLISES ESTRUTURAIS DO PERIANTO, DO ANDROCEU, DO GINECEU E DAS ESTRUTURAS SECRETORAS DE *C. XANTHOCARPA*

As análises morfológicas do perianto, do androceu e do gineceu foram realizadas sob o microscópio estereoscópio Olympus SZH10, com a unidade de controle DP Control 71 da Olympus, com câmara fotográfica acoplada.

Na Figura 1 estão representados os organogramas desenvolvidos para o estudo das partes florais. Para as análises estruturais do

desenvolvimento do perianto, do androceu, do gineceu e das estruturas secretoras, foram utilizadas 3 diferentes técnicas. Primeiramente, 10 botões florais foram seccionados transversal e longitudinalmente, à mão livre. As secções foram colocadas sobre lâminas histológicas, hidratadas e cobertas por lamínula, para visualização sob o microscópio óptico. Mais 10 botões florais foram fixados em glutaraldeído (1%) + formaldeído (4%) (MCDOWELL & TRUMP, 1976), infiltrados com historesina (Leica®), sendo colocados em solução de pré-infiltração (historesina: etanol 95%, 1:1, v/v), durante 24 horas, sob vácuo e, em seguida, transferidos para a solução de infiltração (historesina pura), por 4 horas, sob vácuo. A seguir, foram colocados em moldes que continham a solução de inclusão (historesina adicionada de endurecedor). As secções foram feitas em micrótomo de rotação, distendidas em lâminas histológicas e submetidas à coloração com azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1964), para serem analisados sob o microscópio óptico. Os registros fotográficos e as análises em microscopia óptica foram realizados com auxílio do microscópio óptico Olympus DP40F, com a unidade de controle DP Control 71 da Olympus e com câmara fotográfica acoplada.

A análise ultraestrutural de superfície, em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em amostras retiradas de 10 botões florais que haviam sido fixadas em glutaraldeído e desidratadas em série etílica crescente (até álcool 100% PA) para a obtenção das secções transversais e longitudinais. As secções foram colocadas em eppendorfs contendo álcool 100% por mais 30 minutos e, posteriormente, foram submetidas ao ponto crítico de CO₂ Leica EM CPD 030, conforme Horige & Tamm (1969). Depois da secagem, o material foi aderido em suportes de alumínio, com auxílio de uma fita carbono dupla-face e numerado conforme planejamento prévio. Estes suportes foram postos sobre isopor, numa caixa plástica transparente contendo sílica gel. A caixa foi vedada com PVC e colocada dentro de um desumidificador até ser coberto com 20nm de ouro em metalizador Leica EM CPD 030, modelo CPD 030. A análise e documentação foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

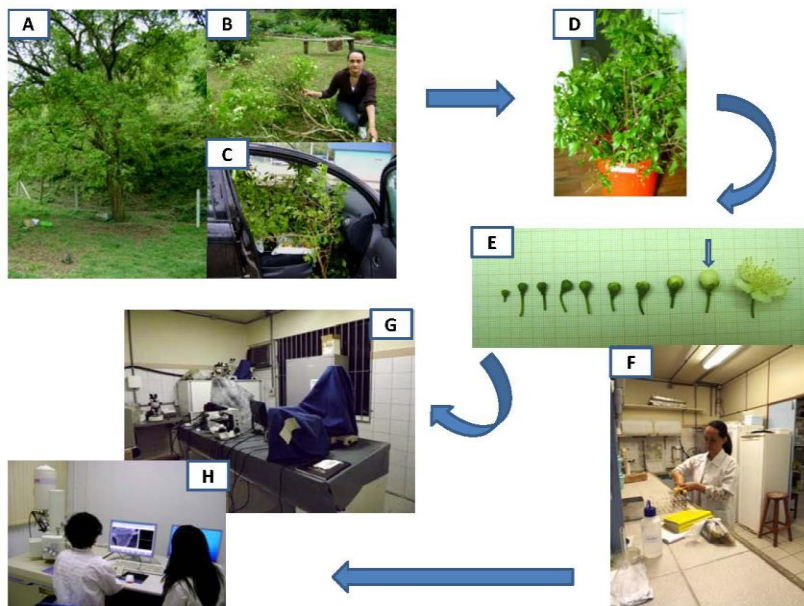


Figura 1 - Metodologias para análise estrutural das partes florais de *C. xanthocarpa*. **A)** Indivíduo adulto em área preservada de mata nativa. **B)** Ramos com botões florais. **C)** Transporte dos ramos com botões florais até o laboratório. **D)** Acondicionamento dos ramos vegetais em baldes com água. **E)** Coleta de botões florais na fase balão (seta). **F)** Botões florais fixados em glutaraldeído (1%) + formaldeído (4%). **G)** Sala de microscopia (LFDGV/UFSC). **H)** Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV (LCME/UFSC).

2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 – FLOR DE CAMPOMANESIA XANTHOCARPA

A análise dos botões florais de *C. xanthocarpa* confirmou os dados constatados na literatura. A flor exibiu estrutura zigomorfa, diclamídea (2 verticilos florais), heteroclamídea (cálice e corola com colorações diferentes), corola dialipétala (pétalas livres entre si), cálice gamosépalo (sépalas parcialmente unidas entre si), polistêmones (numerosos estames), hermafrodita (Figura 2).

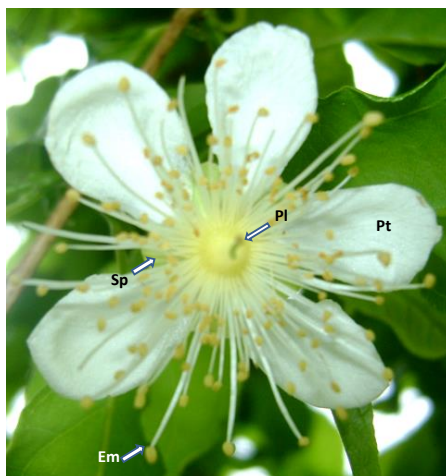


Figura 2 - Flor diclamídea, heteroclamídea e polistêmones de *C. xanthocarpa* em antese, mostrando os estames (Em), o pistilo (Pl), as pétalas (Pt) e as sépalas (Sp).

2.2 – PERIANTO (CÁLICE E COROLA) DE *C. XANTHOCARPA*

Os botões florais na fase balão apresentaram as folhas modificadas estéreis (perianto) e as férteis (androceu e gineceu) inseridas no receptáculo floral (Figura 3A). O cálice apresentou 5 sépalas de coloração verde-clara, com formato de pequenas folhas parcialmente unidas entre si (cálice gamosépalo) (Figuras 3A e 3B). As secções transversais das sépalas mostraram a epiderme como um revestimento uniestratificado, com células poliédricas, recobertas por cutícula, e com tricomas secretores na face adaxial. O conteúdo destes

tricomas mostrou reação positiva ao sudan III, indicando natureza lipídica. O mesofilo das sépalas apresentou parênquima homogêneo clorofilado (clorênquima), com células de tamanhos variáveis e estruturas subepidérmicas secretoras, na face abaxial, glabra e rica em complexos estomáticos (Figuras 3C, 3D, 3E e 3F). A corola mostrou-se formada por cinco pétalas obovadas, com cerca de 1cm, de coloração branca (Figura 4A). As pétalas mostraram-se intensamente vascularizadas, com ramificações até próximo à margem apical (Figura 4B). O mesofilo está formado por um parênquima homogêneo (Figura 4C), apresentando conspícuos espaços intercelulares (Figura 4D) e estruturas secretoras subepidérmicas (Figuras 4C e 4D). A epiderme apresentou-se uniestratificada, evidenciando células com as paredes periclinais externas convexas, na face adaxial (Figura 4D), coberta por cutícula, e com tricomas (Figura 4E). A epiderme está provida de estômatos, na face abaxial (Figura 4F). A observação ultraestrutural revelou que em muitos estômatos não ocorria rompimento da cutícula na região do poro (Figura 4F), indicando que estes complexos estomáticos não seriam funcionais.

O receptáculo é a região mais dilatada do eixo caulinar, onde se inserem as folhas modificadas (SOUZA, 2003), constituindo-se no local de onde emergem os apêndices modificados: sépalas, pétalas, estames e carpelos (MARIATH *et al.*, 2006). As sépalas, como unidades do perianto, mantém características semelhantes às das folhas, sendo usualmente verdes, com estômatos e nervuras (SIMPSON, 2006). Souza (2003) descreve as sépalas como sendo revestidas por epiderme, em geral, simples, com formação de cutícula, estomatífera e pilosa. As células epidérmicas podem ter formatos variáveis, os complexos estomáticos encontram-se na face abaxial e os pelos podem ser secretores. A presença dos estômatos na epiderme da face abaxial facilita as trocas de O₂ e CO₂ e a absorção eficiente do CO₂, que será utilizado na reação de fotossíntese. A cobertura das superfícies celulares pela cutícula impermeável é essencial para prevenção da perda de água (EVANS, 1999). Esta é a primeira barreira de proteção entre as superfícies aéreas das plantas e o meio ambiente e o principal obstáculo ao movimento da água, incluindo o fluxo transpiratório e de solutos. É composta por cutina que forma uma matriz para deposição das ceras, dois materiais hidrofóbicos (RIEDERER & SCHREIBER, 2001). A cutícula e os tricomas secretores de óleos, presentes nas sépalas da espécie em estudo, devem constituir-se em estruturas importantes para manutenção do equilíbrio hídrico do botão floral, assegurando o desenvolvimento adequado das estruturas reprodutivas.

O mesofilo das sépalas é parenquimatoso, quase sempre clorofilado, homogêneo, podendo apresentar cavidades secretoras (SOUZA, 2003). As células do mesofilo podem conter até 10 milhões de cloroplastos em cada centímetro quadrado, pois estes são os locais de realização da fotossíntese (EVANS, 1999). Considerando-se que as sépalas são as partes florais mais expostas a irradiação solar, em *C. xanthophila*, principalmente no botão floral que antecede a antese, explica-se a presença de clorênquima, podendo assim contribuir para produção de metabólitos indispensáveis ao desenvolvimento da flor.

A intensa vascularização das pétalas pode estar associada ao transporte de metabólitos que ficam armazenados no mesofilo e servem para atração de polinizadores. A convexidade das paredes celulares associada à presença de tricomas contribui para refletir a irradiação solar, minimizando efeitos de desidratação dos tecidos internos (LARCHER, 2000). A epiderme das pétalas também é unisseriada e a cutícula pode apresentar ornamentações e/ou tricomas (SOUZA, 2003). Alguns tricomas não mostraram presença de secreção, havendo assim tricomas glandulares e aglandulares. Os tricomas, glandulares ou não, devem contribuir com a proteção ao dessecamento na fase da antese, pois a face adaxial fica mais exposta ao sol. Os estômatos posicionados abaxialmente, estarão assim protegidos da perda hídrica por ocasião da abertura para troca gasosa, indispensável para a intensa atividade mitocondrial que ocorre nos tecidos das partes florais (LAMBERS *et al.*, 1998). Assim, nas pétalas da espécie em estudo, a constatação de estômatos não funcionais deve ser decorrência na não exposição desta face antes da antese, estágio este que posiciona a pétala de modo que a face abaxial fique mais protegida da irradiação solar.

A forma como o perianto de *C. xanthocarpa* mostrou-se estruturado demonstra que a espécie investiu na busca de proteção ao androceu e ao gineceu até que estes estejam aptos a realizar suas funções reprodutivas. Uma epiderme provida de cutícula e pelos secretores na face adaxial previne a dessecação das estruturas e diminui os efeitos da radiação solar. Por outro lado, uma epiderme revestida pela cutícula e com os complexos estomáticos protegidos na face abaxial, permite às partes florais estéreis a realização das trocas gasosas (O₂ e CO₂), a ativação da rota estomática da transpiração, essencial para a absorção dos nutrientes disponibilizados via xilema, e a realização da fotossíntese pelas sépalas, que auxiliam a planta na manutenção da flor que garante a perpetuação da espécie.

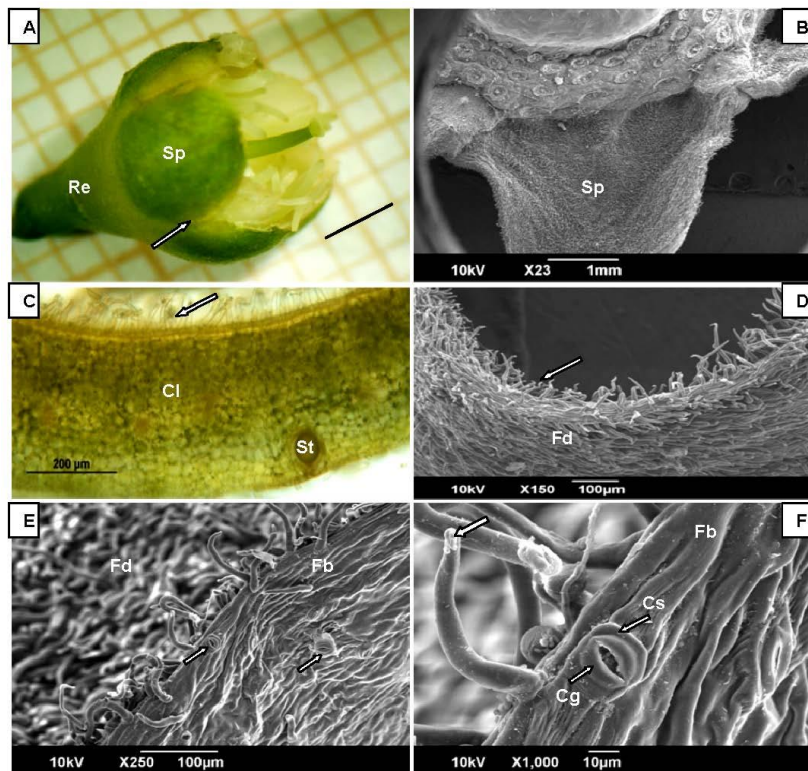


Figura 3 - Cálice de *C. xanthocarpa*. **A)** Sépals parcialmente unidas (seta), de coloração verde clara, inseridas no receptáculo floral. Barra = 2mm **B)** Eletromicrografia de vista frontal de uma sépala. **C)** Secção transversal de uma sépala com epiderme adaxial recoberta por tricomas (seta) delimitando clorênquima homogêneo e estruturas secretoras sob a epiderme abaxial. **D)** Epiderme adaxial (interna) recoberta por tricomas (seta). **E)** Eletromicrografia de uma sépala apresentando a face adaxial, intensamente pilosa, e abaxial de aspecto glabro com vários complexos estomáticos (setas). **F)** Detalhe da epiderme abaxial (externa) constituída por tricomas secretores (seta indicando a secreção na extremidade do tricoma) e complexo estomático formado pelas células-guarda e células subsidiárias. Sp = sépala, Re = receptáculo floral, Cl = clorênquima, St = estrutura secretora; Fd = face adaxial, Fb = face abaxial, Cg = célula-guarda, Cs = célula subsidiária.

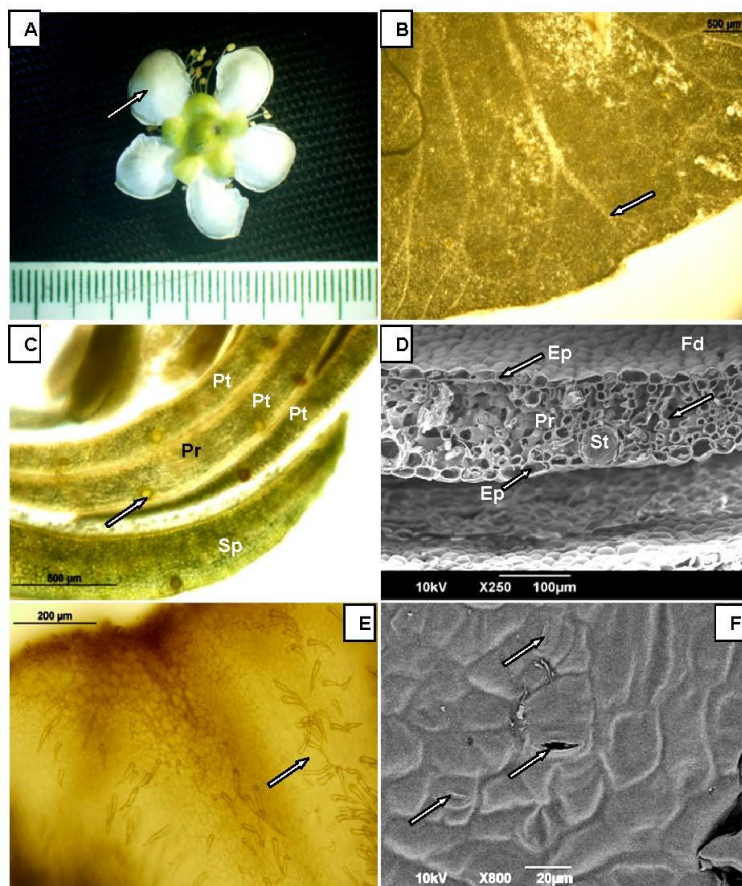


Figura 4 - Corola de *C. xanthocarpa*. **A)** Pétalas obovadas, de coloração branca (seta). **B)** Detalhe da porção apical de uma pétala, mostrando vascularização ramificada até próximo à margem (seta). **C)** Secção transversal das pétalas dispostas em camadas e envolvidas pelas sépalas. São formadas por parênquima homogêneo e estruturas secretoras subepidérmicas (seta). **D)** Pétalas vistas em microscopia eletrônica de varredura, mostrando mesofilo constituído por parênquima homogêneo, com espaços intercelulares (seta) com estruturas secretoras subepidérmicas. Epiderme uniestratificada em ambas as faces da pétala, com as paredes externas convexas das células na face adaxial. **E)** Superfície adaxial de uma pétala com presença de tricomas (seta). **F)** Eletromicrografia da superfície abaxial da pétala com presença de estômatos (setas) na epiderme. Barras = 500 μm (B,C); 100 μm (D); 200 μm (E); 20 μm (F). Pt = pétala, Sp = sépala, Pr = parênquima, Ep = epiderme, St = estrutura secretora, Fd = face adaxial.

2.3 – ANDROCEU DE *C. XANTHOCARPA*

O androceu de *C. xanthocarpa* está constituído por estames providos de filetes alongados que sustentam as anteras no ápice (Figura 5A e 5B). A antera é tetraloculada, com 4 microesporângios, onde formam-se os andrófitos (Figura 5B) e apresentam um conetivo central, onde localiza-se o feixe vascular (Figura 5D). As anteras sofrem deiscência a partir da destruição da parede divisória entre os lóculos da mesma teca (Figura 5E) e do rompimento do tecido externo desta região, havendo a liberação dos andrófitos, através do estômio ou abertura semelhante a uma fenda (Figuras 5B e 5C). As anteras apresentaram uma parede externa epidérmica uniestratificada e uma camada interna subepidérmica, o endotécio, também uniestratificado, porém apresentando espessamentos parietais nas paredes tangenciais internas e nas anticlinais (Figura 5D e 5E). As paredes celulares espessadas não reagiram positivamente à presença de lignina com uso de azul de toluidina, mostrando coloração avermelhada, como as células fundamentais do conetivo e a epiderme (Figura 5D), indicando presença de compostos ácidos. Também foi possível identificar a camada mais interna dos microesporângios, denominada tapete, tecido nutritivo que assegura o desenvolvimento dos andrófitos. O tapete, em *C. xanthocarpa*, mostrou-se formado por tapete parietal, com células intactas, delimitando o lóculo, e por células invasivas, entre os andrósporos e também adjacente ao tapete parietal, evidenciadas como desintegrações de tecido, decorrente do processo de maturação dos micrósporos (Figuras 5E e 5F). Foi possível visualizar os orbículos ou Corpúsculos de Ubish, revestindo a superfície interna do tapete secretor (Figura 5F).

Segundo Souza (2003), a antera tetrasporangiada, madura e seccionada transversalmente mostra o conectivo, região de junção com o filete, onde ocorre o feixe vascular e as duas tecas, cada qual com dois esporângios ou sacos polínicos onde se formam os grãos de pólen. As tecas da antera estão ligadas entre si e com o filete através de um tecido estéril denominado conectivo, que separa os esporângios (MARIATH *et al.*, 2006). A definição dos diferentes tecidos numa antera acontece no início do processo de desenvolvimento da estrutura, desde a iniciação no meristema floral até a antese da flor (MARIATH *et al.*, 2000). Geralmente, como refere Esau (1976), as anteras sofrem deiscência e em muitas espécies a deiscência é precedida pela destruição da parede divisória entre os lóculos da mesma teca (metade da antera). Mais tarde, acrescenta a autora, o tecido externo desta região também sofre

rompimento e o pólen é libertado através da fenda (estômio). Segundo Mariath *et al.* (2006), as anteras apresentam deiscência (abertura espontânea) através de fendas longitudinais ou transversais, poros ou valvas, libertando os andrófitos. Estes autores informam que a ruptura do estômio coincide, aproximadamente, com a abertura da flor. Neste momento, as células estomiais desidratam-se e as paredes celulares contraem-se. Porém, devido aos espessamentos cuticulares e parietais, as dimensões do lado externo das células do estômio permanecem fixas e acabam dobrando-se, rompendo o tecido. Segundo Bittencourt Jr. & Mariath (1997), a constituição química dos espessamentos é, em geral celulósica, acrescido de pequena quantidade de material péctico e lignina.

Esau (1976) descreve a estrutura da antera como tendo a epiderme como parede mais externa, uma camada subepidérmica (endotécio), com deposição de material em arestas ou faixas e, internamente o tapete, que é um tecido nutritivo constituído de células multinucleadas. A autora comenta, ainda, que as camadas localizadas entre o endotécio e o tapete muitas vezes são esmagadas e destruídas durante o crescimento dos androsporângios. Furness & Rudall (1998) afirmam que as funções do tapete são nutrir o tecido esporogênico e os andrósporos, secretar a calose durante a separação das tétrades, sintetizar esporolenina para a formação da parede dos grãos de pólen, produzir os orbículos (corpúsculos de Ubish), sintetizar e liberar sobre o grão de pólen substâncias como o “Pollenkitt” (lipídeos, flavonoides, carotenoides), trífino (mistura de substâncias hidrofóbicas), enzimas e proteínas de reconhecimento. O tapete é uma camada de células ricas em protoplasma, importante fisiologicamente, pois todo nutriente destinado às células-mãe do pólen ou aos andrófitos em desenvolvimento passa por este tecido (SOUZA, 2003). Os orbículos são partículas de forma e tamanho variados impregnadas com esporolenina, que revestem a superfície interna das células do tapete secretor (MARIATH *et al.*, 2006). O conjunto de orbículos forma a membrana tapetal e paratapetal que protegem os grãos de pólen maduros quando o tapete degenera.

Os andrófitos das angiospermas desenvolvem-se a partir de andrósporos haploides formados por meiose no interior dos androsporângios dos estames. Em tais condições, inicia-se o desenvolvimento do andrófito, com a primeira divisão mitótica formando apenas uma célula vegetativa e uma célula-mãe dos gametas masculinos. Nessas condições de desenvolvimento pode ocorrer a antese e o pólen, contendo andrófitos, em diferentes graus de desenvolvimento,

dependendo da espécie, abandona o esporângio que lhe nutriu e é disperso, podendo ocorrer a polinização. Transportado a um estigma receptivo, renova seu ciclo de desenvolvimento (COCUCCI, 1995).

Os estames têm como principal função a produção de esporos (andrósporos) e suas formas maduras, os andrófitos (grãos de pólen). Mas, em algumas espécies ocorrem modificações, como os nectários que servem para atrair os insetos. Também podem gerar estames férteis e outros inférteis, que servem de alimento aos polinizadores devido ao conteúdo proteico. No caso de *C. xanthocarpa*, sua função está ligada à produção dos grãos de pólen, pois não se formam os nectários. Esta flor é polistaminada, ou seja, forma grande quantidade de estames o que pode estar ligado à oferta de pólen para os polinizadores (especialmente insetos).

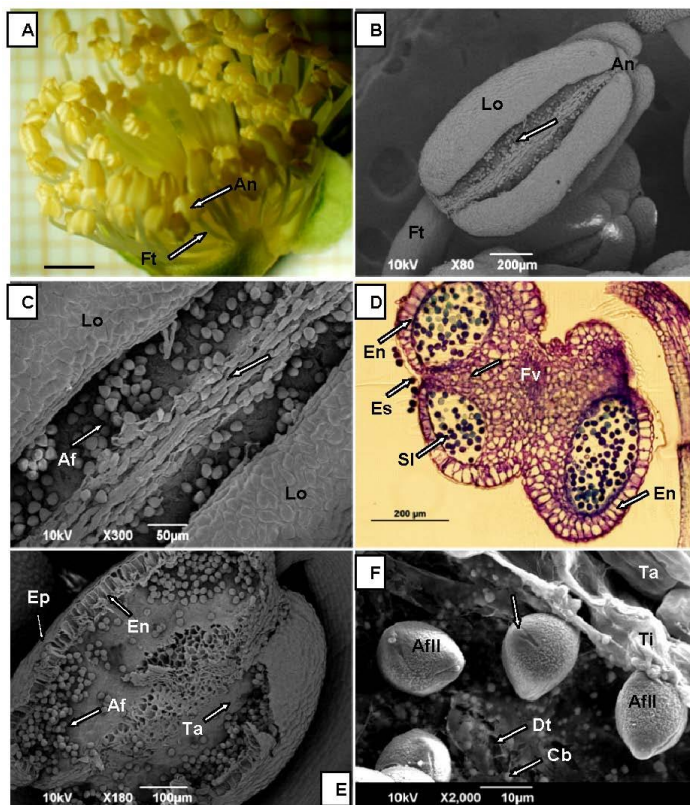


Figura 5 - Estames e andrófitos de *C. xanthocarpa*. **A)** Estames formados pelas anteras e por filetes dispostos ao redor do androceu. Barra = 2mm. **B)** Eletromicrografia da antera deiscente (seta), tetraloculada, sustentada pelo filete. **C)** Antera recoberta pelos andrófitos apresentando destruição da parede divisória entre os lóculos da mesma teca e o rompimento do tecido externo da região (seta), formando o estômio. **D)** Secção longitudinal da antera imatura, mostrando o endotécio não lignificado (coloração púrpura avermelhada) e o parênquima entre os lóculos (seta). Pode-se observar o estômio e os sacos polínicos com micrósporos em seu interior (coloração azul-esverdeada, com azul de toluidina). **E)** Secção longitudinal da antera mostrando o endotécio (seta), sob a epiderme e os andrófitos entre células do tapete. **F)** Andrófitos II: poro de emergência do tubo polínico (seta), células do tapete parietal destruídas, Corpúsculos de Ubish, tapete invasivo entre os andrófitos e células intactas do tapete parietal. An = antera, Ft = filete, Lo = lóculo, Fv = feixe vascular, Af = andrófito, En = endotécio, Es = estômio, Sl = saco polínico, Ep = epiderme, Ta = tapete parietal intacto, Dt = tapete parietal destruído, Ti = tapete invasivo, AfII = andrófito II.

2.4 – GINECEU DE *C. XANTHOCARPA*

Campomanesia xanthocarpa apresenta um estilete alongado interligando a porção apical do gineceu, constituída por estigma, à porção basal, onde se encontra o ovário (Figuras 6A e 6B). O estigma mostrou-se capitado-peltado, com uma fenda central (Figura 6C), que facilita a penetração dos tubos polínicos. É do tipo seco, com as células epidérmicas alongadas formando papilas (Figura 6D e 6E). Estas células papilosas, quando seccionadas (Figura 6F) evidenciaram conteúdo de coloração azulada, significando reação positiva a compostos fenólicos. Logo abaixo das papilas, aparece tecido parenquimático formado por células alongadas transversalmente. Em secção longitudinal da porção apical do estilete, finalizado pelo estigma (Figura 6F), podem ser evidenciadas as terminações da vascularização das folhas carpelares que constituem o gineceu. As células do parênquima fundamental do estilete, assim como as do estigma, apresentam paredes celulósicas que, sob reação com azul de toluidina, mostraram coloração avermelhada (Figura 6F), indicando a presença de compostos ácidos.

O estilete é revestido por uma epiderme uniestratificada e apresenta, tecido parenquimático subepidérmico (Figura 6D), com conspícua reserva de amido (Figura 6F). A fenda observada no estigma (Figura 6E) tem continuidade no estilete, o qual mostrou ser provido de um canal oco, central que se estende até as cavidades ovarianas (Figura 7A). Este canal é revestido pelo tecido transmissor que apresenta células alongadas (Figura 7B).

Em *C. xanthocarpa*, o ovário é ínfero, não havendo uma delimitação nítida do receptáculo e do ovário, e apresenta a parte superior, ligada ao estilete, como um disco mais elevado (Figuras 6A e 6B) com alguns tricomas na superfície. Possui de seis a oito lóculos, com rudimentos seminais bisseriados (Figuras 7C e 7D). A epiderme externa ovariana é fortemente cutinizada e recoberta por tricomas (Figura 7E). O mesofilo, na região ovariana, está constituído por tecido parenquimático (Figuras 7F, 7G e 7H), o qual mostra conspícuos espaços intercelulares (Figura 7G), que devem ter importante papel na reserva de ar. Feixes vasculares ocorrem entremeados ao tecido parenquimático (Figura 7H). Estruturas secretoras estão presentes no mesofilo, sob a epiderme (Figuras 7E e 7G).

O gineceu, verticilo floral que contém os rudimentos seminais, com seu respectivo esporângio, desenvolve uma série de estruturas especializadas que garantem a fecundação. Estruturas como estigma, estilete e tecido transmissor constituem especializações que permitem o

desenvolvimento do andrófito, determinando a trajetória segura para que ocorram o acoplamento, a cópula e a singamia (COCUCCI, 1995). Conforme Esau (1976) é comum no estigma, a presença de células epidérmicas alongadas formando papilas e um tecido glandular secretor de substâncias, que criam um meio adequado à germinação dos tubos polínicos. Com relação à presença de papilas, outros estudos têm registrado estas em estigmas de espécies de Myrtaceae, como em *Eugenia uniflora* (FRANZON, 2008), a qual também apresenta estigma do tipo seco (SILVA & PINHEIRO, 2007). Estigmas do tipo seco também são citados em seis gêneros de Myrtaceae estudados na região central do Brasil (PROENÇA & GIBBS, 1994). De acordo com Lughadha e Proença (1996), esta é uma característica recorrente em Myrtoideae. Nos estigmas do tipo seco, eventos na pré-polinização, incluem o desenvolvimento de uma secreção extracuticular que serve para adesão do pólen compatível e sua hidratação, facilitando a penetração dos tubos polínicos (HESLOP-HARRISON, 2000). Além disso, a secreção pode auxiliar na germinação do grão de pólen e crescimento inicial dos tubos polínicos (CLIFFORD & SEDGLEY, 1993), embora em algumas espécies o crescimento dos tubos seja autótrofo até chegar ao tecido transmissor (HERRERO & DICKINSON, 1980). Souza (2003) menciona a presença de tecido transmissor revestindo os canais ocos do estilete. Segundo Herrero e Dickinson (1979), o crescimento do tubo polínico, no tecido transmissor, é heterótrofo, dependendo das reservas estilares, especialmente de amido. Em *Eugenia uniflora*, os grãos de amido presentes nas células adjacentes ao tecido transmissor desaparecem depois da passagem dos tubos polínicos (RODRIGO & HERRERO, 2000). Os grãos de amido observados no tecido transmissor, em *C. xanthocarpa*, devem ser relevantes para o crescimento dos tubos polínicos, bem, como no deslocamento destes através do estilete. Segundo Mariath *et al.* (2006), o ovário é a porção basal dilatada do carpelo, de cuja superfície interna emergem excrescências formadas por tecidos epidérmicos e subepidérmicos (placenta) para o interior da cavidade central (lôculo) de onde se originam os rudimentos seminiais. Segundo Souza (2003), o mesofilo ovariano apresenta natureza parenquimática, havendo ou não estruturas secretoras.

A maneira como as partes constituintes do gineceu de *C. xanthocarpa* estruturam-se sugere adaptação da espécie, no sentido de facilitar a adesão, o reconhecimento e a germinação dos grãos de pólen compatíveis sobre as papilas estigmáticas, a penetração dos tubos polínicos no estilete, através da fenda no estigma e o percurso através do

canal estilar oco revestido, por tecido que garante a nutrição e guia os tubos polínicos até a entrada do ovário. Entretanto, em *C. xanthocarpa*, a presença de compostos fenólicos não deve estar relacionada com a germinação dos tubos polínicos e sim, provavelmente como forma de defesa a predação. Na região das cavidades ovarianas são produzidos os rudimentos seminais e toda esta porção do gineceu está voltada para a proteção e a manutenção destas estruturas, através dos tecidos parenquimáticos e da vascularização garantindo o aporte de nutrientes e água. Os septos que dividem os lóculos apresentam a continuidade do canal estilar oco, guiando os tubos polínicos até os rudimentos seminais no sentido de garantir a cópula através da micrópila, a descarga dos gametas no saco embrionário e a singamia, permitindo a continuidade desta espécie.

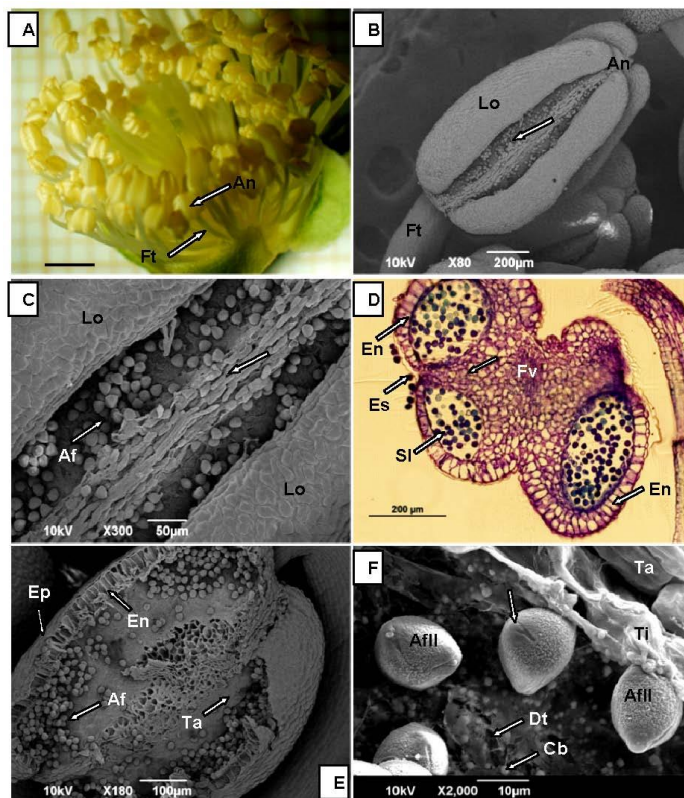


Figura 6 - Gineceu de *C. xanthocarpa*. **A e B)** Gineceu visto sob microscópio estereoscópio (A) e sob o microscópio eletrônico de varredura (B) apresentando o estigma localizado no ápice do estilete e a porção superior do ovário ínfero, mostrando-se como um disco mais elevado, com alguns tricomas na superfície. **C)** Estigma seco e capitado-peltado, mostrando a fenda central (seta). **D)** Secção transversal do estigma-estilete mostrando as papilas estigmáticas coradas em azul (fenóis), o parênquima que preenche o estilete (cor púrpura-avermelhada), os feixes vasculares (cor vermelha), as células esbranquiçadas (provável reserva de amido) e a epiderme simples do estilete. **E)** Detalhes do estigma mostrando a fenda estigmática e as células epidérmicas alongadas formando papilas. **F)** Detalhe da região estigma-estilete com células esbranquiçadas logo abaixo das papilas, uma região de células alongadas transversalmente (seta), as células esbranquiçadas adjacentes ao parênquima e os feixes vasculares. Eg = estigma, Ei = estilete, Ov = ovário, Ep = epiderme, Pr = parênquima, Ps = papila estigmática, Fv = feixe vascular, Ra = reserva de amido, Fs = fenda estigmática. Barras = 2mm (A), 1mm (B), 100 μ m (C), 20 μ m (D,F), 50 μ m (E).

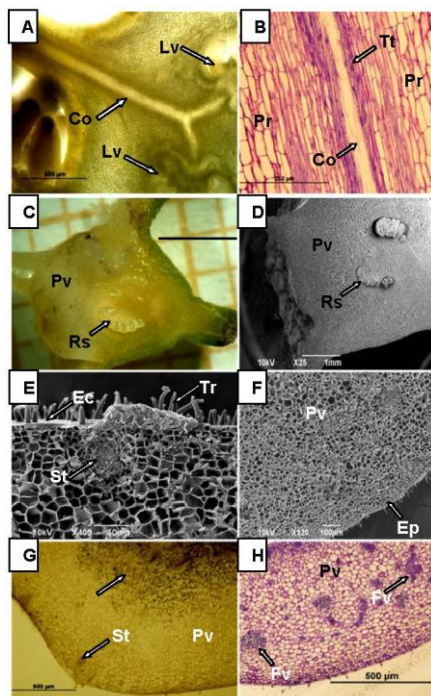


Figura 7 - Estilete e ovário de *C. xanthocarpa*. **A)** Secção longitudinal do gineceu, mostrando o canal estilar oco, estendendo-se até os lóculos ovarianos. **B)** Canal estilar oco com aparente depósito de secreção, revestido pelo tecido transmissor (cor púrpura avermelhada) envolvido pelo parênquima. **C e D)** Detalhe do ovário sob o microscópio estereoscópio (**C**) e em microscopia eletrônica de varredura (**D**) mostrando os rudimentos seminais seriados se desenvolvendo nas cavidades ovarianas e a região parenquimática. **E)** Eletromicrografia da secção transversal do ovário mostrando a epiderme externa cutinizada e recoberta por tricomas. Estrutura secretora abaixo da epiderme. **F, G e H)** Secções longitudinais em microscopia eletrônica de varredura (**F**) e microscopia óptica (**G e H**) do ovário mostrando a epiderme com presença de tricomas (em **F**) e o mesofilo constituído por parênquima apresentando conspícuos espaços intercelulares (seta em **G**) e presença de estruturas secretoras (em **G**). Em **H** pode-se ver regiões púrpuro-avermelhadas marcando a presença da parede primária nas células parenquimáticas. Ao redor dos feixes vasculares de coloração púrpura mais intensa, evidenciam-se as células formadoras da bainha do feixe. Barra = 2mm (**C**). Co = canal estilar oco, Lv = lóculo ovariano, Pr = parênquima, Tt = tecido transmissor, Pv = parênquima ovariano, Rs = rudimento seminal, Ec = epiderme cutinizada, Tr = tricoma, St = estrutura secretora, Ep = epiderme, Fv = feixe vascular.

2.5 – ESTRUTURAS SECRETORAS EM *C. XANTHOCARPA*

Campomanesia xanthocarpa mostrou estruturas secretoras em todas as partes formadoras da flor, sendo mais abundantes nas sépalas, no filete, no estilete e na região ovariana. Testes histoquímicos com sudan, revelaram a presença de óleos em dois tipos de estruturas, glândulas (Figuras 8A a 8D) e tricomas (Figuras 8E e 8F). As glândulas são estruturas subepidérmicas, constituídas por um tecido secretor que delimita um espaço interno (Figuras 8C e 8D), no qual acumula-se a secreção oleosa. O tecido secretor (epitélio secretor) está constituído por três camadas de células (Figura 8C). Os tricomas secretores de óleo, presentes nas partes florais de *C. xanthocarpa* são unicelulares, mais dilatados na base e afilados na extremidade (Figura 8E), por onde é liberada a secreção (Figura 8F). Estas estruturas mostraram-se abundantes na face adaxial das sépalas, em menor número na base da face adaxial das pétalas, nos filetes dos estames, no estilete e na superfície ovariana.

De acordo com Platt & Thomson (1992), as células produtoras de óleo secretam seus produtos dentro de cavidades. O epitélio secretor destas estruturas, esclarecem os autores, é formado por três camadas de células: uma camada externa, uma camada média suberizada e uma camada interna. Complementam esclarecendo que, depois que a camada interna é depositada, uma cavidade é formada, rodeada pela membrana plasmática anexada numa protusão em forma de sino chamada cúpula. Uma camada suberizada é depositada sobre a epiderme selando a glândula de óleo, prevenindo o contato das células ao redor com substâncias potencialmente tóxicas. Segundo Gogosz (2010), as glândulas secretoras de *C. xanthocarpa* são abundantes em praticamente todos os órgãos, com exceção da raiz. Alguns autores classificam a glândula de óleo das Myrtaceae como tendo origem lisígena, outros, porém, classificam-nas como esquizógenas (FAHN, 1982). Segundo Esau (1974), lisogenia e esquizogenia podem ser combinadas na formação de espaços secretores. A formação destas estruturas, em *C. xanthocarpa*, foi verificada por Gogosz (2010), sugerindo que ocorre a partir da combinação de esquizogenia, em um primeiro momento, e lisogenia, na fase final do seu desenvolvimento, tratando-se, portanto de glândula esquizo-lisígena. Além disso, na glândula plenamente formada, as células encontram-se rompidas na região periférica da cavidade. Ainda, segundo Gogosz (2010), o conteúdo destas células ocorre de diferentes formas e, segundo o resultado do teste com sulfato ferroso, tratam-se de compostos fenólicos. Segundo Beltrati & Paoli (2003), a

presença de compostos fenólicos em órgãos totalmente diferenciados é relacionada com os mecanismos de interação entre plantas e animais, agindo como dissuasivo alimentar e reduzindo a herbivoria. Além disso, quando as plantas estão sob estresse hídrico, os compostos fenólicos acumulados nos vacúolos garantem a manutenção do arcabouço celular e integridade dos tecidos. Taiz & Zeiger (2002) referem-se à existência de uma série de compostos fenólicos, com diferentes funções nas plantas. Podem reduzir o crescimento de plantas vizinhas (alelopatia), dão suporte mecânico às estruturas vegetais, permitem o crescimento ascendente e o transporte de água pelo xilema sem colapso das estruturas, o que pode ter permitido às plantas colonizarem o ambiente terrestre e diminuem a digestibilidade pelos herbívoros (lignina), produzem sinais visuais e olfativos (carotenoides e flavonoides). Os flavonoides formam a maior classe de compostos fenólicos e são as antocianinas (atraem animais para as flores e frutos), as flavonas (protegem dos danos causados pela luz ultravioleta), os isoflavonoides (apresentam atividade antimicrobiana) e os taninos que inibem o ataque de herbívoros.

Segundo Souza (2003), os tricomas glandulares apresentam uma porção apical, uni ou pluricelular e uma outra, que funciona para o pelo como um pedúnculo. A ocorrência dos tricomas secretores, provavelmente, deve ter implicações na ecologia da espécie. Diversos trabalhos têm relatado a função dos tricomas na defesa da planta contra herbivoria (CUTTER, 1987; THEOBALD *et al.*, 1979). Também há relatos sobre sua interferência no processo de fotossíntese devido a alterações na luz absorvida, regulação da temperatura foliar e redução da evapotranspiração (SMITH *et al.*, 1997). A presença de tricomas tem também importância em estudos de sistemática comparativa (THEOBALD *et al.* 1979).

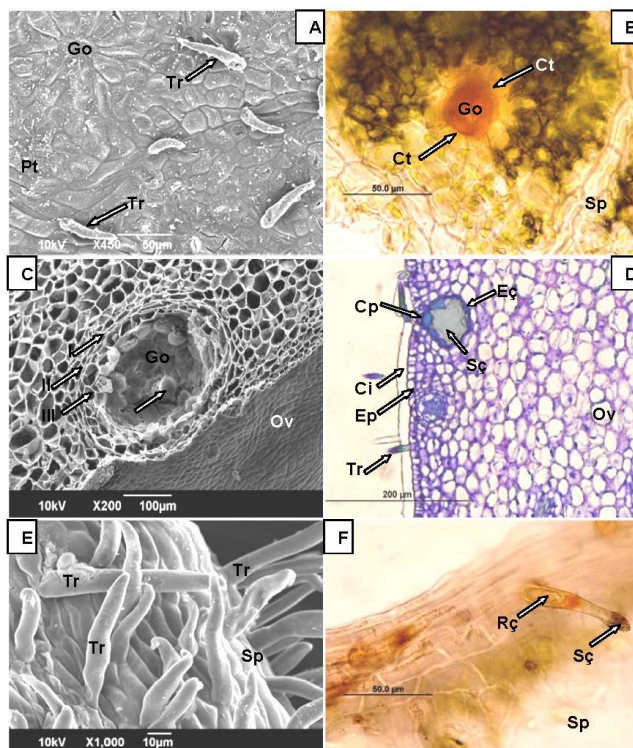


Figura 8 - Glândulas de óleo e tricomas em partes florais de *C. xanthocarpa*. **A)** Vista frontal da face abaxial da pétala evidenciando a glândula de óleo e os tricomas. **B)** Secção paradérmica da face adaxial da sépala apresentando a glândula de óleo, em reação positiva ao Sudam III e o arranjo das células do epitélio secretor na região glandular. **C)** Eletromicrografia de secção transversal do ovário apresentando a glândula de óleo rodeada pelo epitélio secretor formado por três camadas de células (I, II, III). Detalhe da secreção depositada dentro da cavidade glandular (seta). **D)** Secção longitudinal do ovário com glândula de óleo evidenciando a secreção em seu interior, o epitélio secretor (em azul) e a região da cúpula. Pode-se ver a espessa camada cuticular sobre a epiderme unisseriada e a presença de tricomas. **E)** Eletromicrografia da face adaxial da sépala recoberta por tricomas secretores (setas). **F)** Secção paradérmica da borda da sépala evidenciando o tricoma unicelular apresentando reação positiva ao Sudam III na base e a secreção sendo extrusada no ápice. Go = glândula secretora, Tr = tricoma, Pt = pétala, Ct = célula secretora, Sp = sépala, (I, II, II) = camadas do epitélio secretor, Ov = ovário, Cp = cúpula, Ec = epitélio secretor, Sc = secreção, Ci = cutícula, Ep = epiderme, Rc = região secretora.

3- CONCLUSÃO

Analizando a estrutura das partes florais de *Campomanesia xanthocarpa* pode-se concluir que:

1. A espécie investiu em estruturas de proteção nas sépalas (cutícula, glândulas de óleo e tricomas) e em mecanismos, provavelmente, ligados à rota transpiratória estomática e à fotossíntese (abundância de complexos estomáticos e cloroplastos), as quais permanecem nas flores envolvendo o androceu e o gineceu.
2. As pétalas servem de mecanismo de proteção ao androceu e ao gineceu até a antese, devido à presença de glândulas de óleo e ao formato convexo das células que formam um “estojo” envolvendo os órgãos reprodutivos.
3. O androceu polistêmonico provavelmente assume papel de atração aos polinizadores pela abundância de pólen e material proteico que representam, além de desenvolver as anteras que garantem a produção de gametas funcionais e facilitam a sua dispersão no momento da antese, favorecendo à polinização cruzada.
4. O gineceu estrutura-se de forma a facilitar a adesão e a germinação dos grãos de pólen compatíveis, a penetração e o crescimento dirigidos dos tubos polínicos, a cópula e a descarga dos gametas, nos rudimentos seminais, com a consequente singamia, promovendo a fecundação e a formação de novos indivíduos.
5. As glândulas de óleo e os tricomas secretores são estratégias extras adotadas pela espécie, no sentido de preservar as partes florais dos estresses ambientais, bióticos e abióticos, a fim de garantir a perpetuação e a ocupação de novos espaços em seu habitat natural, através da reprodução sexuada.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECK, C.B. **An introduction to plant structure and development**. Cambridge University Press. New York. United States of America. 2010.
- BELTRATI, C.M. & PAOLI, A.A.S. Sementes. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, UFV. 2003.
- BITTENCOURT JR, N.S. & MARIATH, J. E. A. Ontogenia dos estratos parietais da antera de *Tabebuia pulcherrima* Sandw. (Bignoniaceae). **Acta Botanica Brasilica** **11**: 9-30. 1997.
- CLIFFORD, S.C., SEDGLEY, M. Pistil structure of *Banksia menziesii* R. Br. (Proteaceae) in relation to fertility. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, **v.41, n. 4-5**, p.481-490.1993.
- COCUCCI, A.E.; MARIATH, J.E.A. Sexualidade das plantas. **Ciência Hoje**, **v.18, n.106**. 1995.
- CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal: órgãos, experimentos, interpretações**. v.2. São Paulo, Roca. 1987.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Ed. Edgard Blücher. São Paulo - SP. 1976.
- EVANS, J.R. Leaf anatomy enables more equal access to light and CO₂ between chloroplasts. **New Phytologist** **143**, p 93-104. 1999.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 3rd ed. New York, Pergamon. 1982.
- FRANZON, R.C. – Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) – **Tese (Doutorado em Ciências)**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS. 2008.
- FURNES, C. A., RUDALL, P. J. The tapetum and systematic in monocotyledons. **The Botanical Review** **64**: 201-239.

GOGOZS, A.M.; COSMO, N.L.; BONA, C.; SOUZA, L.A. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). **Acta Botânica Brasileira**. **24(3)**. 2010.

HERRERO, M., DICKINSON, H.G. Pollen-pistil incompatibility in *Petunia-hybrida* – changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. **Journal of Cell Science, Cambridge**, v. **36**, p. 1-18. 1979.

HERRERO, M., DICKINSON, H.G. Pollen-tube growth following compatible and incompatible intraspecific pollinations in *petunia-hybrida*. **Planta**, v.**148**, n.**3**, p.217-221. New York. 1980.

HESLOP-HARRISON, Y. Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. **Annals of Botany. (Suppl. A)** **85**: 5–13. 2000.

HORRIDGE, G.A. & TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science** **163**: 817-818. 1969

LAMBERS, H.; STUART, F. & PONS, T.L. **Plant Physiological Ecology**. Springers-Verlag, New York. 1998.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, Rima Artes e Textos. 2000.

LIMA, D. F., GOLDENBERG, R., SOBRAL, M. O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia** **62 (3)**: 683-693. 2011.

LUGHADHA, E.N.; PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.**83**, n.**4**. St. Louis. 1996.

MCDOWELL, E.M. & TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** **100**: 405-414. 1976.

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR. N. S. Flor. In. **Anatomia Vegetal**. Ed. APEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GURREIRO, S. M.; Viçosa, UFV, 437p. 2006.

MARIATH, J. E. A., MOÇO, M. C. C., OLIVEIRA, J. M. S., DE TONI, K. L., SANTOS RINALDO, P. E., SANTOS, R. P. Embriologia: atualidade e importância na ciência botânica. In **Tópicos Atuais em Botânica** (T. B. CAVALCANTI coord.). EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia/ Sociedade Botânica do Brasil, Brasília, p. 95-100. 2000.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. & MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** **59**: 368-373. 1964.

PLATT, K. A., & THOMSON, W.W. Idioblast oil cells of avocado: Distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry, and biochemistry. **International Journal. of Plant Science**, **153**: 301–310. 1992.

PROENÇA, C., GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from central Brazil. **New Phytologist**, **v.126**, p. 343-354, 1994.

RIEDERER, M., and L. SCHREIBER. Protecting against water loss: Analysis of the barrier properties of plant cuticles. **Journal of Experimental Botany** **52**: 2023–2032. 2001.

RODRIGO, J., HERRERO, M. **Cuajados erráticos en albaricoquero. Polinizacion y calidad de flor**. Zaragoza: institucion Fernando el Católico. 2000.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana** . 2. ed. Porto Alegre: SAGRA, 1989.

SILVA, A.L.G.; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasilica**, **v.21**, **n.1**. Brasília. 2007.

SIMPSON, M.G. **Plant systematics**. Elsevier, Amsterdam. 2006.

SOUZA, L. A. de **Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula**. Ed. UEPG. Ponta Grossa – PR. 2003.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Artmed. Porto Alegre – RS. 2004.

THEOBALD, W.L., KRAHULIK, J.L., ROLLINS, R.C. Trichome description and classification. In: **Anatomy of the Dicotyledons**, 2nd ed., vol. I, *Systematic Anatomy of Leaf and Stem, with a Brief History of the Subject*, C. R. Metcalfe and L. Chalk. Clarendon Press, Oxford, p. 40–53. 1979.

WILSON, P.G.; O'BRIEN, M.M.; HESLEWOOD, M.M.; QUINN, C.J. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution** **251**: 3-19. 2005.

SEÇÃO III

**ANÁLISE DO PÓLEN, DA POLINIZAÇÃO CRUZADA E DA
POLINIZAÇÃO GEITONOGÂMICA EM *Campomanesia*
xanthocarpa O. Berg. (MYRTACEAE)**

Formatado para publicação

CRISTINA MAGALHÃES RIBAS DOS SANTOS

Analysis of pollen, cross-pollination and self-pollination in *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae): implications for species conservation and domestication

Cristina Magalhães Ribas dos Santos¹, Marisa Santos² and Miguel Pedro Guerra³

^{1,3} Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-000, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

² Laboratório de Anatomia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

¹ Corresponding author. Email: cristinaribassantos@gmail.com

LIST OF TABLES – SEÇÃO III

Table 1 - Time intervals, in hours, for collection and number of flowers non-pollinated and pollinated (cross-pollinated and self-pollinated) of <i>C. xanthocarpa</i>	136
Table 2 - Classes for evaluation of pollen tube growth in the stylus of <i>C. xanthocarpa</i>	139
Table 3 - Time collection, in hours, number of floral buds with pollen tube growth and classes of growth of pollen tubes according to the location in pistils (class 1 – stigma; class 2 - stigma-half of the stylus; class 3 - half and 2/3 of the stylus; class 4 - 2/3 of the stylus-input ovary; class 5 - penetrating the ovary; class 6 - penetrating the ovules) of <i>C. xanthocarpa</i>	147

LIST OF FIGURES – SEÇÃO III

Fig. 1 - Different rates of germination of <i>C. xanthocarpa</i> pollen grains:	139
Fig. 2 - Germination of <i>C. xanthocarpa</i> pollen grains over time in culture medium consisting of 1 g of agar in 100ml of distilled water with a concentration of 20% sucrose and 40 mg L ⁻¹ of boric acid. Arrows indicate the pollen tubes. Bar = 200µm (a-d).	140
Fig. 3 - Pollen tube growth of <i>C. xanthocarpa</i>	141
Fig. 4 - Pollen tube features resulting from cross-pollination, self-pollination and growth classes in <i>C. xanthocarpa</i>	148
Fig. 5 - Cross-pollination and self-pollination of <i>C. xanthocarpa</i> .	150

Abstract

Campomanesia xanthocarpa Berg. (Myrtaceae), popularly known as “guavirova”, is a native species of the Brazilian Atlantic Forest Biome, a biodiversity hotspot. However, few studies have reported on the reproductive biology of this species, whose nutritional and medicinal properties are neglected and underutilized. The objective of this work was to study the reproductive biology of *C. xanthocarpa* associated with features of its pollination, in particular the possible occurrence of self-incompatibility. The plant material was originated from plants located in Alfredo Wagner City, Santa Catarina State, in southern Brazil. To analyze the development of pollen tubes, germination tests were performed *in vitro*. Controlled pollination and the collection of buds at predetermined times were conducted to evaluate the reproductive system. Data were submitted to ANOVA, and when significant differences ($P < 0.05\%$) were detected, analysis was submitted to Tukey’s range test. Average pollen germination was 36.24%, and apical, subapical, vacuolar and nuclear pollen zones were observed. In controlled cross-pollination, germination began within two hours, and pollen tubes were observed growing in an organized pattern, following the stigma toward the ovary and then fertilizing 100% of the flowers. This system showed no barriers 72h after pollination. In the self-pollination experiments, germination started 16 hours later. In contrast to cross-pollination, pollen tubes grew in a disorganized pattern into the stylus in 40% of the flowers, and no penetration into the ovules was observed. These results demonstrate inhibition of pollen tube growth and suggest the occurrence of homomorphic gametophytic self-incompatibility (GSI) in this species.

INTRODUCTION

According to FAO (2010), climate change will produce entirely new standards that may drastically alter the conditions for agriculture in the future. Agricultural production, especially in the poorest and most food insecure countries, will suffer the greatest impacts. Therefore, the demand for germplasm adapted to these new conditions will be intensified, and native genetic diversity will ensure a swift and rapid response to these new challenges. The domestication of native plants, including those already known and used by local or regional farmers offers a great opportunity for countries rich in genetic resources (Coradin *et al.* 2011).

Guabirobeira (*C. xanthocarpa*) belongs to the Myrtaceae family, which comprises about 100 genera and 3000 species of trees and shrubs distributed over all continents, except Antarctica, predominantly in tropical and subtropical regions of the planet. A large number of species of Myrtaceae native vegetation can be found in Brazil, and several of them are located in the southern states (Marchiori and Sobral 1997). *Campomanesia xanthocarpa* produces fruits that are highly appreciated by humans, besides serving as food for associated fauna (Lorenzi 1992). These fruits are eaten raw and used for the preparation of liqueurs, juices and jellies. The high content of phenolic compounds (1616 ppm 100g⁻¹) and vitamin C (233.56 mg 100g⁻¹) qualifies the fruit as a functional food. The texture of the fruit may be attributed to the high content of pectin. This fruit has technological potential as a result of its nutritional and sensory properties (Santos *et al.* 2009). In this context, *C. xanthocarpa* was included as a priority species in the initiative called "Plants for the Future" put forth by the Brazilian Ministry of Environment and aimed at exploring new ways to utilize the rich Brazilian biodiversity (Coradin *et al.* 2011).

Knowledge of the mode of reproduction of a plant species becomes important, among other things, for the management and conservation of plant genetic resources and also for their domestication, a fundamental step toward achieving greater success in the use of native species. Studies of pollen-pistil interaction, as well as the manner and time in which fertilization takes place, are some of the aspects that should be studied to elucidate the reproductive process (Souza 1996). The presence of self-incompatibility, which prevents self-fertilization and thus encourages outcrossing, is an aspect of great importance for the viability of the commercial production of fruits (Bruckner *et al.* 2005).

Like many of our native species, little is known about the reproductive biology of *C. xanthocarpa*. Therefore, the present work aimed to study the reproductive biology of this species, seeking to assess and record the behavior of its pollen, the possible occurrence of self-incompatibility mechanisms, and the behavior of cross-pollination.

MATERIAL AND METHODS

Collection of samples

Floral branches to perform cross-pollination and self-pollination were collected in the middle-lower region of a tree (S1) and in an environmental remnant of native forest located near Alfredo Wagner City, Santa Catarina State, (latitude 27°42'01", longitude 49°20'01") at 480 m altitude. Branches 1.5 meters in length with floral buds at different developmental stages were placed in plastic buckets containing water for transport to the laboratory.

Pollen for germination *in vitro* and for controlled manual pollination was extracted from the floral buds collected during balloon stage (before anthesis), separated into paper bags, identified and placed in polystyrene boxes with ice for transportation. For cross-pollination, a mixture of pollen was taken from trees near S1 and designated S2, S3 and S4. The buds and pollen were obtained from the same tree (S1) for self-pollination.

Material samples taken from individual S1 were deposited in the herbarium of the Federal University of Santa Catarina (FLOR number 40926) and identified by Cristina Magalhães Ribas dos Santos.

Extraction of the pollen

To extract pollen for the different treatments, anthers were removed from floral buds and left to dry on absorbent paper during 24 h at ambient temperature of 20° C. Three mL of identified pollen were stored in 5 mL eppendorf tubes. The tubes were placed in 20 ml Falcon tubes containing silica gel and stored in the refrigerator at 7° C for 24 hours, (adapted from Franzon *et al.* 2006).

Analysis of in vitro germination of pollen grains

The culture medium was prepared, following Miranda and Clement (1990), with 1 g of agar in 100 ml of distilled water with a concentration of 20% sucrose and 40 mg L⁻¹ boric acid dispensed into 4 Petri dishes in a volume of 10 ml per dish.

With the aid of a fine brush, 0.3 mL of pollen used in the different treatments were spread on the medium and dispensed in Petri

dishes that were sealed with plastic PVC film and placed into a chamber for BOD (Biological Organism Development) at 25° C under 12 hours of light.

After the start of germination, an optical microscope was used to perform counts of the material germinated every 4 hours until 24 hours of incubation had been completed, in 4 randomly chosen fields in each of 4 replicates. Pollen was considered germinated when the pollen tube length exceeded its own diameter (Stanley and Linskens 1974). Analysis of samples for the development of pollen tubes was carried out from the Petri dishes distributed on histological slides, stained with acetic carmine at 0.5%, and covered by glass slides for observation under optical microscopy, following Franzon *et al.* (2006). The observations were performed using a DP40F Olympus microscope equipped with an Olympus DP71 with digital camera.

Emasculation of the floral buds and implementation of controlled manual cross-pollination and self-pollination

The treatments with controlled manual pollination were performed in separate controlled environmental conditions (25° C and 12 hours light).

In floral branches maintained in plastic buckets containing water, floral buds were emasculated in the balloon stadium (removal of petals and stamens). Each pollination experiment (cross-pollination and self-pollination) used 250 floral buds. For each experiment, more than 250 floral buds were bagged without pollinate (Table 1). The pollen stored for 24 hours under refrigeration for each treatment was placed directly on the stigma of the emasculated floral buds. These were identified with colored ribbons to mark the different collection times, a procedure adapted from Franzon *et al.* (2006; Table 1).

Collection of pollinated floral buds and analysis of growth of pollen tubes using fluorescence microscopy

Floral buds originated from the different pollination treatments were taken from floral branches and placed into 20 mL Falcon tubes with fixative solution FAA (formaldehyde: acetic acid: ethanol 70° GL, 1:1:9) for 24 hours and then transferred to ethanol solution 70° GL (Johansen 1940).

Under a stereoscopic microscope equipped with an Olympus SZH10 control unit and Olympus DP 71 digital camera, pistils were excised, transferred to 25 mL beakers containing 10 mL of NaOH 9 N, and placed in an oven at 60° C for 10 minutes. The pistils were removed

from the oven, washed with distilled water, transferred to histological slides, stained with 0.1% aniline blue in KH_2PO_4 , and then covered and compressed with another histological slide (Martin 1959).

Observations of the growth of pollen tubes at different collection times were carried out using a Leica DMI6000 B Confocal Scanner TCS SP5 coupled with a Laser Diode 405 nm UV line. The analysis of the growth of pollen tubes at different collection times (Table 1) permitted their separation into classes of growth (Table 2), as adopted by Franzon (2008) for *Eugenia uniflora* (Myrtaceae).

Statistical analysis

The obtained data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and when significant differences ($P < 0.05\%$) were detected, analysis of multiple means comparison was performed following Tukey's range test (Steel et al. 1997). All statistical analyses were performed using the SAS program, version 8.0 (SAS 2002)

Table 1 - Time intervals, in hours, for collection and number of flowers non-pollinated and pollinated (cross-pollinated and self-pollinated) of *C. xanthocarpa*

Collection time after controlled manual cross-pollination and self-pollination	Number of non-pollinated flowers	Number of flowers (cross-pollinated)	Number of flowers (self-pollinated)
BP*	20	10	10
2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h AP**	$(10 \times 6) \times 2 = 120$	$10 \times 6 = 60$	$10 \times 6 = 60$
16h AP	20	10	10
24h, 32h, 40h, 48h, 56h, 64h, 72h AP	$(10 \times 7) \times 2 = 140$	$10 \times 7 = 70$	$10 \times 7 = 70$
96h, 120h, 144h, 168h, 192h, 216h, 240h AP	$\{10 + (15 \times 6)\} \times 2 = 200$	$10 + (15 \times 6) = 100$	$10 + (15 \times 6) = 100$
Total Flowers Used	500	250	250

* BP = before pollination; **AP = after pollination

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of *in vitro* germination of pollen grains

Analysis of pollen germination cultivated *in vitro* showed that after 4 hours of incubation, the average rate of germination was 5.34%. After 8 hours, the rates were 12.9%, increasing to 17.98% after 16

hours, and then stabilizing at 36.24% after 20 hours of incubation (Fig. 1, 2).

Franzon *et al.* (2006), working with pollen of *C. xanthocarpa*, found average rates of germination of 55.8% for pollen grains collected after anthesis and 27.6% for materials collected at the balloon stage. These authors found germination rates 8.64% higher for pollen grains with floral buds at the balloon stage. This difference may have resulted from the use of 20% sucrose in the culture medium (Franzon and collaborators used 10%) because sucrose helps maintain osmotic balance between the pollen tube and the culture medium and, moreover, provides the energy required for tube growth (Stanley and Linskens 1974). Compared to the study of Franzon *et al.*, who collected pollen at the anthesis stage, i.e., the final stage of maturation, we instituted a one-hour delay, collecting pollen at the earlier balloon stage. At this stage of development, the pollen to be used in the treatment of controlled pollination will not be mixed with pollen coming from other specimens, thus ensuring its origin. Also, floral buds at this stage do not need to be bagged, facilitating experimental activities.

The tricolporate and monad pollen grains of *C. xanthocarpa* (Fig. 3a, b) started germination after 2 hours of incubation, but could not be considered because of the reduced size of pollen tubes in relation to the diameter of pollen grains. At the beginning of the process, the pollen tube emerges through the pore, allowing the inner contents of the grain to move within the tube (Fig. 3c). After 4 hours of incubation, it was then possible to consider the germination of the pollen grains because pollen tubes were bigger than the diameter of pollen grains, showing rapid growth (Fig. 3d).

Cheung (1996) and Johri *et al.* (2001) relate the growth of pollen tubes to the increased concentration of calcium (Ca^{++}) ions in the apical zone, forming a gradient that promotes deposition of materials that form the plasma membrane and cell wall by increasing the length of the tube. These materials are synthesized in organelles located in the subapical zone and transported to the apical zone by secretory vesicles through the Golgi complex.

After 20 hours of observations, the different apical zones, including subapical, nuclear and vacuolar, which form the pollen tube, could be observed. The apical zone appears as a transparent and spherical region at the apex of the tube (Fig. 3e). According to Mariath *et al.* (2006), the cell wall in this region is formed by pectins that confer gelatinous consistency, favoring growth. This zone disappears when growth ceases.

The subapical zone appears as a compact region (cytoplasmic) (Fig. 3e). According to Johri *et al.* (2001), this region is rich in cellular organelles, such as mitochondria, Golgi complex, smooth and rough endoplasmic reticulum, vesicles, lipid bodies and amyloplasts. This could explain the intense red color from staining with acetic carmine. Vegetative and generative cells were observed in the nuclear zone of the pollen tube (Fig. 3f). According to Cocucci and Mariath (1995), the vegetative cell has great structural complexity because it is linked to longevity and germination of the tube. Among the several organelles that form the vegetative cell, dictyosomes stand out. These organelles are responsible for constructing the cell wall and the extension of the plasmalemma, allowing the pollen tube to grow by several centimeters. The authors claim that vegetative cells, as well as generative cells, have a high degree of chromatin condensation and reduction system organelles. Once individualization of its cytoplasm is completed, both ends of the generative cell are found inside the vegetative cell. Both generative and vegetative cells are connected through the plasmodesmas which cross the plasma membranes (Yu *et al.* 1992).

It was also possible to identify the vacuolar zone of the pollen tube (Fig. 3f) where, according to Mariath *et al.* (2006), the formation of callose plugs occurs. In this region, on the inner cell wall surface, the callose layer appeared thicker. The transversal callose plugs can be seen in Figure 3f, splitting the pollen tube into compartments. According to the authors, the function of callose is to isolate the main areas of the tube with more active cytoplasm, keeping it confined to the apex.

Images showing the growth of pollen tubes of *C. xanthocarpa* also indicate the cell wall (Fig. 3d, e, f). According to Johri *et al.* (2001), this is formed by cellulose, pectin and callose. Mariath *et al.* (2006) claim that cellulose is not produced in the apical area, but only along the tube. In addition, the pectins are found in the entire tube wall in all regions, while callose is present along the cell wall and will be deposited in accordance with tube elongation.

The whitish coloration of the cell wall suggests the presence of callose on the side walls along the tubes. This material is hydrophobic, which allows waterproofing and the isolation of the contents inside the tube in relation to the medium surrounding it, which may explain the absence of the red color by acetic carmine staining. In addition, the callose present in the pollen tubes reacts with a component of aniline blue, producing a fluorescent compound in ultra violet (UV) light. The green fluorescent tubes are differentiable pistil tissue (Martin 1959),

which permitted detection of the differences between cross-pollination and self-pollination experiments.

Table 2 - Classes for evaluation of pollen tube growth in the stylus of *C. xanthocarpa*.

Classes	Pollen Tube Growth in Stylus *
2	Pollen tube not exceeding the stigma
3	Pollen tube from the stigma and half of the stylus
4	Pollen tube between half and 2/3 of the stylus
5	Pollen tube between 2/3 of the stylus and the input of the ovary
6	Pollen tube penetrating the ovary

* Adopted by Franzon (2008)

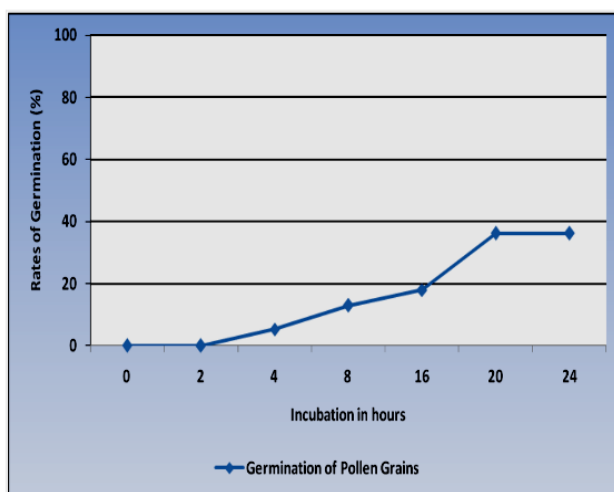


Fig. 1 - Different rates of germination of *C. xanthocarpa* pollen grains: After 4 hours of incubation (5.34%); After 8 hours of incubation (12.9%); After 16 hours of incubation (17.98%); After 20 hours incubation (36.24%).

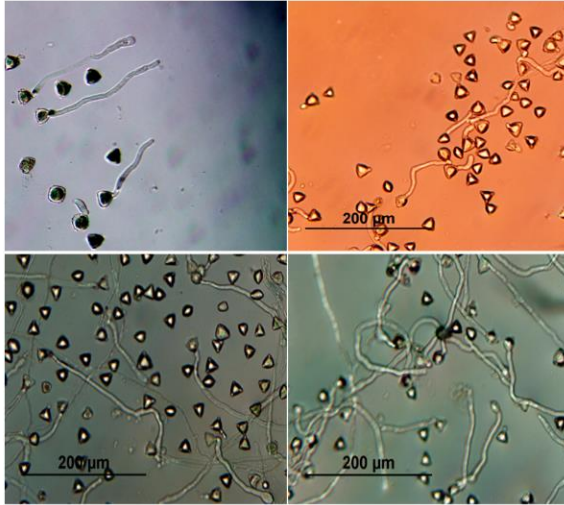


Fig. 2 - Germination of *C. xanthocarpa* pollen grains over time in culture medium consisting of 1 g of agar in 100ml of distilled water with a concentration of 20% sucrose and 40 mg L⁻¹ of boric acid. Arrows indicate the pollen tubes. Bar = 200µm (a-d).

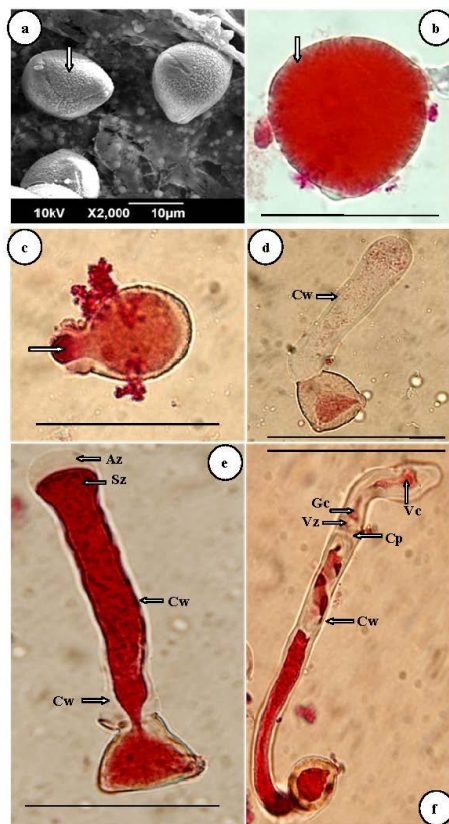


Fig. 3 - Pollen tube growth of *C. xanthocarpa*: **a**, **b**) Pollen grain, tricolporate, monad; **c**) early germination with pollen tube extruded through the pore and migration of the content of the grain (arrow) (2 hours of incubation); **d**) pollen grain considered germinated (4 hours incubation), showing the cell wall (arrow); **e**) pollen grain with pollen tube, showing the apical clear zone (arrow) and cytoplasmic compact subapical zone (arrow); **f**) pollen grain with pollen tube compartmentalized, showing nuclear zone, vegetative cell (arrow), elongated generative cell, and vacuolation zone. One observes deposition of callose plug (arrow). In various images of Figure 3 (d, e, f), the cell wall of pollen tubes (arrows) with whitish coloration can be observed. Bar = 500µm (b-f). Az = apical zone; Sz = subapical zone; Vc = vegetative cell; Gc = generative cell; Vz = vacuolation zone, Cp = callose plug, Cw = cell wall.

Analysis of the growth of pollen tubes resulting from the cross-pollination and self-pollination

The unpollinated floral buds, which were used as control for these experiments, showed no pollen grains on the stigma (Fig. 4a, d). Furthermore, the ovaries did not show any development and aborted 64 hours after the start of the experiments.

Cross-pollination showed fast germination of pollen grains with the presence of pollen tubes in Class 2 in 100% of floral buds after 2 hours (Fig. 4e, f). Class 3 was detected in 100% of floral buds after 8 hours, with the pollen tubes growing profusely in an organized way in the channel of the stylus (Fig. 4h, i). After 12 hours, 80% of the floral buds showed Class 4 growth with pollen tubes in the initial portion of the ovary (Fig. 4k, l). Class 5 was achieved after 32 hours with pollen tubes growing up in the ovary of 80% of floral buds (Fig. 4n, o). By 72 hours, the pollen tubes were around or penetrating the ovules (Class 6) in 100% of floral buds analyzed (Fig. 4q, r), demonstrating the efficiency of this process in *C. xanthocarpa*.

Self-pollination showed different behavior relative to the growth of pollen tubes. The entire process was slower. Only 20% of the floral buds showed Class 2 growth 16 hours after pollination (Fig. 4f, g). Class 3 was detected in 40% of floral buds 32 hours after pollination (Fig. 4i, j). In addition to the lower number of floral buds with pollen tube growth, it was observed that the pattern of development up to Class 3 was disorganized with no definite direction in the channel of the stylus (Fig. 4g, h). Class 4 was observed after 56 hours in 20% of floral buds, with few pollen tubes in the final portion of the stylus (Fig. 4l, m). After 96 hours of self-pollination, 20% of floral buds showed Class 5 growth, with a few pollen tubes in the initial portion of the ovary. At this time, it was observed that the plant tissues showed early oxidation, signaling senescence and cell death (Fig. 4 p). Analyses were performed up to 168 hours of self-pollination, at which time the abortion of floral buds was initiated. After 120 hours, no Class 6 samples were detected. Furthermore, the plant tissues were oxidized, leading to the elimination of floral buds by the plant (Fig. 4s). These results show the absence of ovule fertilization and the presence of some mechanism that prevents self-fertilization in this species. All results are summarized in Table 3.

By analyzing the behavior of pollen from the cross-pollination experiments, it was possible to observe the growth of pollen tubes. Specifically, after 4 hours of incubation, *in vitro* pollen grains were considered to be germinated. In the cross-pollination experiment, pollen

germinated on the stigma and pollen tubes in the stylus of floral buds after 2 hours.

According to Johri *et al.* (2001), the stigmatic surface is specialized in retaining pollen, providing the necessary humidity for germination. In the case of *C. xanthocarpa*, we found that the stigma is the dry-type and rich in papillae (Fig. 4b). Dry stigma is covered by a cuticle layer protected by a protein which enables the recognition of incompatible pollen (Went and Willemse 1984). The secretion released by the papillae facilitates adhesion, humidity and disruption of the cuticle, making it discontinuous or cracked such that it facilitates the penetration of pollen tubes through the stylus (Heslop-Harrison 2000). Proença and Gibbs (1994) found dry-type stigmas with unicellular papillae in five genera of Myrtaceae in central Brazil. *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) showed the presence of papillae in compact dry stigma (Franzon 2008), which were similar to those reported in this work. This seems to be common in Myrtoideae, a group that includes all genera of Myrtaceae species that have fleshy fruits, such as *C. xanthocarpa*. In the cross-pollination experiments, it was observed that, after germination, pollen tubes of *C. xanthocarpa* penetrated the stigmatic fissure (Fig. 4b), following a hollow stylus channel (Fig. 4c). According to Johri *et al.* (2001), a hollow stylus channel extends from the stigma to the ovary and is lined by glandular cells covered by secretions where pollen tubes pass. In *C. xanthocarpa*, the stylus channel goes beyond the entrance of the ovary, extending to the cavities of the ovary, where the ovules are located (Fig. 4c). Weber (1994) and Johri *et al.* (2001) argue that the secretions along the stylus channel are composed of various combinations of polysaccharides, lipids, phenols, pectins, proteins, antioxidants, amino acids, boron and calcium. For Rodrigo and Herrero (2000), these secretions function to nourish and guide pollen tubes during their journey to the ovary.

The speed of growth of pollen tubes until reaching ovules is variable in angiosperms and may take a few hours or days (Edlund *et al.* 2004). Pound *et al.* (2003) found that in *Eucalyptus nitens* (Myrtaceae), pollen tubes reached the ovules two weeks after pollination. For *Acca sellowiana*, it was still possible to observe tubes in the micropyle channel fifteen days after fertilization, and fertilization itself occurred 21 days after pollination (Fisher 2004). In *Eugenia uniflora*, pollen tubes reached the ovaries of the flowers on the third day and penetrated the ovules on the fourth day after pollination (Franzon 2008). For *C. xanthocarpa*, pollen tube growth is relatively fast. Two hours after pollination begins, the growth and the migration of pollen tubes

occurred in an organized pattern and in great quantity, from the stigma to the ovary, with penetration in the ovules three days after pollination in 100% of the flowers. The speed of growth of pollen tubes appears to be important for the reproductive success of the plant, since it minimizes possible damage by such unfavorable abiotic factors as excessive rainfall or wind (Tangmitcharoen and Owens 1997). This strategy can be configured in an adaptive mechanism that protects against unfavorable climatic factors in the flowering period, thus ensuring proper fertilization and fruit formation. In addition, plant populations are formed by allogamous individuals that are genotypically different and generally have a high level of heterozygosity, which enables better efficiency in colonizing new habitats.

The species studied showed a high reproductive efficiency because it facilitates and accelerates coupling, copulation and subsequent syngamy, ensuring the production potential of the fruits and seeds that will determine its perpetuation in nature and occupation of new habitats. Knowledge of reproductive mechanisms can also facilitate the domestication of *guabirobeira* and its introduction in intensive production systems.

When compared to cross-pollination, self-pollination showed a different pattern of behavior of pollen tubes. There was an abnormal spiraled growth in the stylus characterized by an absence of definite direction, narrowing of the wall, and formation of a bulb at the apex of the tube (Fig. 4g h). Using a fluorescence technique, Kho and Baer (1968) demonstrated this behavior, in which a meshwork of incompatible pollen forms in the style, with the apical region of the pollen tube increasing. These characteristics are usually found in species which express gametophytic self-incompatibility (GSI) (De Nettancourt 1977). In this system, the pollen grain germinates, and an incompatibility reaction occurs between the pollen tube and stylus (Schifino-Wittmann and Dall'Agnol 2002).

This incompatibility is revealed in three possible pollination conditions. First, self-incompatible pollination occurs when both S alleles are identical (\times S1S2 S1S2) for both cross-pollination and self-pollination. Second, a partial match occurs when half of the pollen grains are compatible, and the other half are incompatible as a result of the presence of an allele in common (\times S1S2 S1S3). Third, full compatibility occurs when the two are different S alleles (\times S1S2 S3S4) (Bueno *et al.* 2006). Since the pollen grains show expression independently by segregating 1:1, the crossings can be compatible,

totally incompatible, or semi-compatible (Richards 1997; Takayama and Isogai 2005).

When considering self-incompatibility reactions, pollen-pistil interactions may prevent the germination of pollen grains or pollen tube growth, highlighting the activation of self-incompatibility. In the GSI system, the reaction generally occurs between the incompatible pollen grain and stigmatic papillae, in which the pollen grain is deposited such that it cannot germinate or rehydrate (Takayama and Isogai 2005). The authors add that the recognition of incompatible pollen that occurs in the stylus is determined by the haploid genome pollen grain and that its rejection occurs during the development of the pollen tube, when both determinants, male and female, carry the same S-haplotype. Inheritance is usually monofactorial, governed by one S locus, which has a variable number of alleles (Richards 1997). The number of S alleles in different populations of different species is quite variable and can be very high in species that have high fertility rates. Having a large number of different alleles in a population is important because it ensures a sufficient number of compatible pollinations without compromising fertility (Heslop Harrison, 1983). The GSI system is considered the most widely distributed in angiosperms found in the Solanaceae, Rosaceae, Papaveraceae, Liliaceae, Onagraceae, Leguminosae, Commelinaceae and Amaryllidaceae families (Gibbs 1986). It is also found in many orders of angiosperms considered primitive, such as Magnoliales, Winterales, Hamamelidales and Nymphaeales (Richards 1997).

In the Solanaceae, Rosaceae, and Scrophulariaceae families, the determinant female is a ribonuclease (S-RNase) expressed in the stylus and an F-box protein expressed in pollen grain (Takayama and Isogai 2005). In *Papaver rhoeas* (Papaveraceae), incompatibility is also under gametophytic control (GSI), and in this family, the S-protein female determinant recognized by the pollen grain was observed. After recognizing the S-haplotype, Ca^{++} influx into the pollen tube occurs, causing a signaling cascade that results in a rapid inhibition of its development and, finally, death of the incompatible pollen tube (Franklin-Tong *et al.* 2002). These results suggest that the GSI system could be acting in *C. xanthocarpa*.

In many families of plants, including the Myrtaceae and *Campomanesia* genera, self-incompatibility is late-acting self-incompatibility (LSI). In the Apocynaceae (Lipow and Wyatt 1999), Bignoniaceae (Gibbs and Bianchi 1999) and Myrtaceae (Pound *et al.* 2003), no differences were observed in growth, tube number or development in proportion to fertilized ovules between compatible and

incompatible plants. In the Myrtaceae, evidence of an LSI mechanism was identified in the following species: *Eucalyptus regnans* (Sedgley *et al.* 1989), *E. woodwardii* (Sedgley and Smith 1989), *E. cladocalix* and *E. leptophylla* (Ellis and Sedley 1992), *Thryptomene calycina* (Beardsell *et al.* 1993), *Blepharocalyx salicifolius*, *Campomanesia velutina*, *C. pubescens*, *Siphoneugena densiflora* (Proença and Gibbs 1994), *Gomidesia feniziana*, *G. lindeniana* and *G. pubescens* (Nic Lughadha 1998), *Metrosideros excelsa* (Schmidt-Adam *et al.* 1999), *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* (Pound *et al.* 2002) and *E. nitens* (Pound *et al.* 2003).

For *Acca sellowiana* (Myrtaceae), both germination of pollen grains on the stigma and the growth of pollen tubes toward the first third of the stylus were observed one day after self-pollination (T1) and cross-pollination (T2) treatments (Finatto *et al.* 2011). Two days after T1 and T2, the tubes reached half of the stylus, and on the fourth day, most of the pollen tubes reached the base of the stylus, confirming the results obtained by Santos *et al.* (2007) for that species. At four days after pollination in both self-pollination and cross-pollination, these authors found that pollen tubes grew in the stylus to reach the ovary, showing LSI. For *Eugenia uniflora*, no difference in the growth of pollen tubes was observed in either treatment, although growth occurred without definite direction and folding, close to ovules in some materials, indicating that the mechanism active in this species is LSI (Franzon 2008). In *Campomanesia velutina* and *C. pubescens*, the pollen tubes penetrated the ovules with the same frequency as that seen in cross-pollination, and rejection came a week after fertilization (Proença and Gibbs 1994). This behavior was not detected in the present work because the pollen tubes had an abnormal growth in the early developmental stages, suggesting the occurrence of a rejection mechanism in the channel of the stylus. Furthermore, pollen tubes were not found nearby or penetrating the ovules, with abortion of floral buds after 168 hours of self-pollination. This leads us to affirm that homomorphic gametophytic self-incompatibility (GSI) is the system that best fits *C. xanthocarpa*. This mechanism prevents inbreeding, promoting crosses between individuals, leading to heterosis. Thus, self-incompatibility has implications for the domestication and breeding of this species, among other by the need of establish commercial orchards with different varieties in order to assure the fruit-set and the abundant fruit production.

Table 3 - Time collection, in hours, number of floral buds with pollen tube growth and classes of growth of pollen tubes according to the location in pistils (class 1 – stigma; class 2 - stigma-half of the stylus; class 3 - half and 2/3 of the stylus; class 4 - 2/3 of the stylus-input ovary; class 5 - penetrating the ovary; class 6 - penetrating the ovules) of *C. xanthocarpa*.

Time Collection	Not pollinated	Self-pollinated		Cross-pollinated	
	Floral buds with pollen tube growth	Floral buds with pollen tube growth	Classes of growth of pollen tubes	Floral buds with pollen tube growth	Classes of growth of pollen tubes
BP*	0	0 (a) A	-	0 (a) A	-
2 hAP**	0	0 (a) A	-	5 (b) B	2
4h AP	0	0 (a) A	-	5 (b) B	2
6h AP	0	0 (a) A	-	5 (b) B	2
8h AP	0	0 (a) A	-	5 (b) B	3
10h AP	0	0 (a) A	-	5 (b) B	3
12h AP	0	0 (a) A	-	5 (b) B	3 e 4
16h AP	0	1 (a) A	2	5 (b) B	3 e 4
24h AP	0	0 (a) A	-	5 (b) B	4
32h AP	0	2 (a) A	3	5 (b) B	4 e 5
40h AP	0	2 (a) A	1	5 (b) B	5
48h AP	0	2 (a) A	1 e 3	5 (b) B	5
56h AP	0	2 (a) A	2 e 4	5 (b) B	5
64h AP	early abortion of flowers	1 (a) A	2	5 (b) B	5
72h AP	aborted flowers	1 (a) A	4	5 (b) B	6
96h AP	aborted flowers	2 (a) A	4 e 5	5 (b) B	6
120h, 144h AP	aborted flowers	0 (a) A	-	5 (b) B	6
168h, 192h, 216h e 240h AP	aborted flowers	aborted flowers	-	5 (b)	6

Means followed by different letters: lowercase letters in the column and uppercase letters in the row, differ to a significance level of 5% in the Tukey test. *BP = before pollination, **AP = after pollination

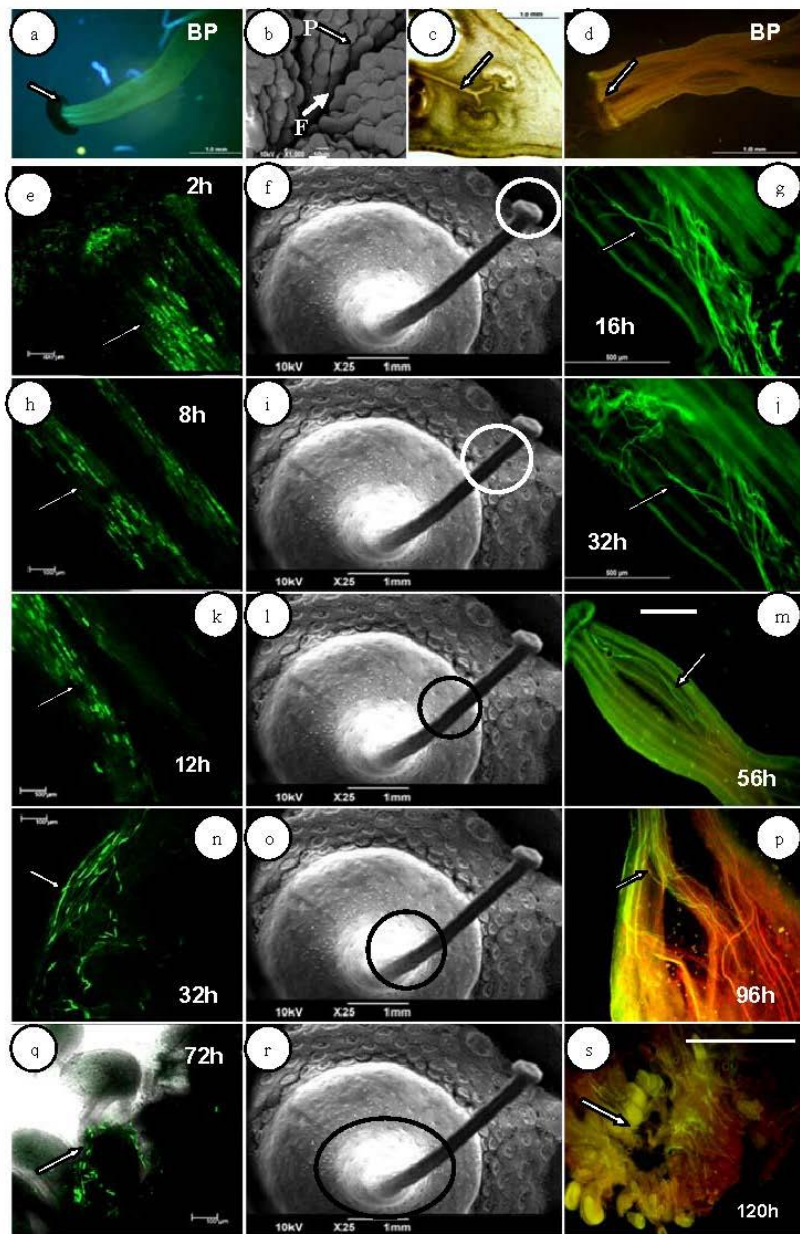


Fig. 4 - Pollen tube features resulting from cross-pollination, self-pollination and growth classes in *C. xanthocarpa*: **a,d**) BP: stigmas

without pollen grains (arrows); **b**) Stigma with papillae (P) and stigmatic cleft (F); **c**) Hollow channel and its extension to the ovarian cavity (arrow); **(e-g)** Class 2; **e**) 2hAP cross-pollination; pollen tubes in the style (arrow); **f**) Location class 2; **g**) 16hAP self-pollination; pollen tubes moving disorganized in stylus (arrow); **(h-j)** Class 3; **h**) 8hAP cross-pollination; pollen tubes migrating in large numbers (arrow); **i**) Location class 3; **j**) 32hAP self-pollination; pollen tubes disorganized in the stylus (arrow); **(k-m)** Class 4; **k**) 12hAP cross-pollination; pollen tubes (arrow); **l**) Location class 4; **m**) 56hAP self-pollination; few pollen tubes in channel (arrow); **(n-p)** Class 5; **n**) 32hAP cross-pollination; pollen tubes in the ovary; **o**) Location Class 5; **p**) 96hAP self-pollination; pollen tubes at the entrance of the ovary; **(q-s)** Class 6; **q**) 72hAP cross-pollination; pollen tubes around the ovules (arrow); **r**) Location Class 6; **s**) 120hAP self-pollination; absence of pollen tubes in the region of the ovules (arrow); Bars = 1 mm (a, c, d, f, i, l, m, o, r), 500µm (g, j, p, s), 100 µm (e, h, k, n, q), 10 µm (b); P= papilla, F = stigmatic fissure.

The behavior of the development of pollen tubes, over time, in the treatment of self-pollination and cross-pollination is best seen in Figure 5, where the efficiency of cross-pollination and any barriers to self-pollination in *C. xanthocarpa* become clear.

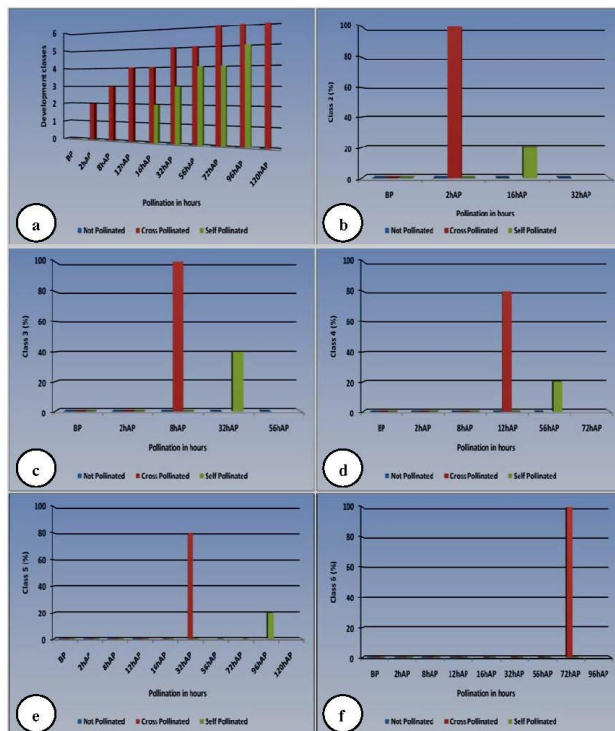


Fig. 5 - Cross-pollination and self-pollination of *C. xanthocarpa* a) Classes of growth of pollen tubes at different days after pollination.

b) Percentage of flowers with pollen tubes in Class 2 growth in pistils (100% 2hAP cross-pollination) (20%, 16hAP self-pollination).

c) Percentage of flowers with pollen tubes in Class 3 growth in pistils (100%, 8hAP cross-pollination) (40%, 32hAP self-pollination).

d) Percentage of flowers with pollen tubes in Class 4 growth in pistils (80% 12hAP cross-pollination) (20%, 56hAP self-pollination).

e) Percentage of flowers with pollen tubes in Class 5 growth in pistils (80% 32hAP cross-pollination) (20%, 96hAP self-pollination).

f) Percentage of flowers with pollen tubes in Class 6 growth in pistils (100%, 72hAP cross-pollination) (0% self-pollination).

CONCLUSIONS

This work presented the following results related to pollination, cross-pollination and self-pollination in *C. xanthocarpa*:

- 1) Pollen collected in the balloon presents high viability for controlled crosses.
- 2) Culture medium with 1 g of agar in 100mL of distilled water with a concentration of 20% sucrose and 40 mg L⁻¹ of boric acid allows for efficient evaluation of the viability and germination of pollen grains.
- 3) This species shows high reproductive efficiency because two hours after pollination begins, the growth and migration of pollen tubes occurred in an organized pattern and in great quantity, from the stigma to the ovary, with the penetration in the ovules three days after pollination in 100% of the flowers. This facilitates and accelerates coupling, copulation and subsequent syngamy.
- 4) The existence of homomorphic gametophytic self-incompatibility (GSI) in this species can be concluded.

REFERENCES

- Beardsel DV *et al.* (1993) Reproductive biology of australian Myrtaceae. Australian Journal of Botany **41**.
- Bruckner CH *et al.* (2205) Autoincompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. (Eds NTV Junqueira, MF Braga) (Embrapa Cerrados: Planaltina DF)
- Bueno LCS *et al.* (2006) Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos. (UFLA: Lavras)
- Coradin L *et al.* (2011) Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região sul. (Ministério do Meio Ambiente: Brasília)
- Carvalho TCP (1989) Comportamento de algumas cultivares de ameixeira japonesa (*Prunus salicina*) quanto à polinização no Rio Grande do Sul. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado). Escola de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Cheung AY (1996) Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. Trends in Plant Science v.1 n.2.
- Coccuci AE and Mariath JEA (1995) Sexualidade das plantas. Ciência Hoje **8**, n.106.
- De Nettancourt D (1977) Incompatibility in angiosperms. (Springer: Berlin).
- Ellis MF and Sedgley, M (1992) Floral morphology and breeding system of three species of *Eucalyptus*, section *Bisectaria* (Myrtaceae). Australian Journal of Botany **40**.
- Edlund AF *et al.* (2004) Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. Plant Cell **16**.
- Finatto T *et al.* (2011) Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae) Australian Journal of Botany **59**.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010) The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture: Rome, Italy)

Franzon RC *et al.* (2006) Germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.). Revista Ceres **53**, n.305.

Franzon RC Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) – Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS. 2008

Franklin-Tong VE *et al.* (2002) Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. Plant Journal **29**.

Gibbs PE (1986) Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? Plant Systematics and Evolution **154**.

Gibbs PE and Bianchi MB (1999) Does Late-acting self-incompatibility (LSI) Show family Clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. Annals of Botany **84**.

Heslop-Harrison J (2000) Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. Annals of Botany **85** (Supplement A)

Heslop-Harrison J (1983) Self-incompatibility: phenomenology and physiology. Proceedings of the Royal Society of London **218**.

Johri BM *et al.* (2001) Reproductive biology of angiosperms. In Reproductive Biology of Plants (Eds BM Johri, PS Srivastava) (Narosa Publishing House: New Delhi)

Johansen DA (1940) Plant microtechnique (McGraw Hill: New York)

Kho YO and Baer J (1968) Observing pollen tubes by means of fluorescence. Euphytica **17**.

- Lipow SR and Wyatt R (1999) Floral morphology and late-acting self-incompatibility in *Apocynum cannabinum* (Apocynaceae). *Plant Systematics and Evolution* **219**.
- Lorenzi H (1992) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. (Plantarum: Nova Odessa/SP)
- Mariath JEA *et al.* (2006) Flor. In Anatomia vegetal (Eds B Apezatto-da-Gloria and SM Carmello-Guerreiro) (UFV: Viçosa)
- Martin FW (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* **34**.
- Marchiori JNC and Sobral M (1997) Dendrologia das angiospermas: Myrtales. (Ed. da UFSM: Santa Maria)
- Miranda PA and Clement CR (1990) Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. *Revista de Biologia Tropical* **38**.
- Nic Lughadha E (1998) Preferential outcrossing in *Gomidesia* (Myrtaceae) is maintained by a post-zygotic mechanism. In: Reproductive biology in systematics, conservation and economic botany. (Eds SJ Owens, PJ Rudall) (Royal Botanic Gardens, Kew: London)
- Pound LM *et al.* (2002) Self-incompatibility in *Eucalyptus Globulus* spp. *globulus* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **50**.
- Pound LM *et al.* (2003) Pollen tube growth and early ovule following self and cross-pollination in *Eucalyptus nitens*. *Sexual Plant Reproduction* **16**.
- Proença C and Gibbs P (1994) Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from central Brazil. *New Phytologist* **126**.
- Richards AJ (1997) Plant Breeding Systems. (Chapman & Hall: USA)
- Rodrigo J and Herrero M (2000) Cuajados erráticos em alboricoquero. Polinización y calidad de flor. (Institución Fernando el Católico: Zaragoza)

Santos MS *et al.* (2009) Caracterização físico-química, extração e análise de pectinas de frutos e *Campomanesia xanthocarpa* B. (Gabirola). Semina: Ciências Agrárias **30**, n^o1.

Santos KL *et al.* (2007) Evidência da atuação do sistema de autoincompatibilidade tardia em *Acca sellowiana* (Berg) Burret. (Myrtaceae). Revista Brasileira de Fruticultura **29**, n.1.

Schifino-Wittmann MT and Dall'Agnol M (2002) Auto-incompatibilidade em plantas. Ciência Rural **32**, n.6.

Schmidt-Adam G *et al.* (1999) Floral biology and breeding system of pohutukawa (*Metrosideros excelsa*, Myrtaceae). New Zealand Journal of Botany **37**.

SAS (2002) Statistical analysis system version 8.0 – getting started with the SAS learning edition (SAS Institute Inc. Cary: NC)

Sedgley M and Smith RM (1989) Pistil receptivity and pollen tube growth in relation to the breeding system of *Eucalyptus woodwardii* (Symphyomyrtus: Myrtaceae). Annals of Botany **64**.

Sedgley M *et al.* (1989) Pollen tube growth and early seed development in *Eucalyptus regnans* B. Muell. In relation to ovule structure and preferential outcrossing. Australian Journal of Botany **37**.

Souza MAD (1996) Biologia reprodutiva de onze espécies de Myrtaceae em floresta de terra firme na Amazônia Central. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM. 1996.

Stanley RG and Linskens HF (1974) Pollen biochemistry management. (Heidelberg, Berlin)

Steel GDR *et al.* (1997) Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. (McGraw Hill Inc.: New York)

Takayama S and Isogai A (2005) Self-incompatibility in Plants. Annual Review Plant Biology **56**.

Tangmitcharoen S and Owens JN (1997) Floral Biology, Pollination, Pistil Receptivity, and Pollen Tube Growth of Teak (*Tectona grandis* Linn f). *Annals of Botany* **79**.

Yu HS *et al.* (1992) Sperm cells in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L.: three-dimensional reconstruction, cytoplasmic diminution, and quantitative cytology. *Protoplasma* **168**.

Weber M (1994) Stigma, style, and pollen tube pathway in *Smyrniium perfoliatum* (Apiaceae). *International Journal of Plant Science*. **155**.

Went JLV and Willemse MTM (1984) Fertilization. In: *Embryology of Angiosperms*. Ed. BM Johri (Springer-Verlag: Berlin)

SEÇÃO IV

DESENVOLVIMENTO ESTRUTURAL DE EMBRIÕES, SEMENTES E FRUTOS DE *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (MYRTACEAE)

CRISTINA MAGALHÃES RIBAS DOS SANTOS

LISTA DE TABELAS – SEÇÃO IV

Tabela 1 - Intervalos de tempo (em horas) para coleta e quantidade de botões florais de <i>C. xanthocarpa</i> , submetidos à polinização cruzada controlada em cada tempo:.....	170
Tabela 2 - Tempos de coletas de flores em antese (diâmetro médio dos ovários em mm) e frutos correlacionados a uma escala de tamanhos (diâmetro em milímetros) após a polinização cruzada controlada de <i>C. xanthocarpa</i>	177

LISTA DE FIGURAS – SEÇÃO IV

Figura 1 - Metodologias utilizadas para análise estrutural de frutos, sementes e embriões de <i>C. xanthocarpa</i>	173
Figura 2 - Padrão sigmoidal de desenvolvimento dos frutos de <i>C. xanthocarpa</i>	178
Figura 3 - Estádios de desenvolvimento dos frutos, sementes e embriões de <i>C. xanthocarpa</i>	181
Figura 4 - Fruto, sementes e embriões de <i>C. xanthocarpa</i> cinco dias (120h DP), após a polinização cruzada controlada.	183
Figura 5 - Fruto, sementes e embriões de <i>C. xanthocarpa</i> dez dias (240h DP) após a polinização cruzada controlada.	186
Figura 6 - Fruto, semente e embriões de <i>C. xanthocarpa</i> trinta e sete dias (840hDP) após a polinização cruzada controlada.	188
Figura 7 - Fruto de <i>C. xanthocarpa</i> , 39 dias após a polinização (936h DP).	192
Figura 8 - Semente e embrião de <i>C. xanthocarpa</i> 39 dias após a polinização (936h DP).	197

RESUMO

Durante 45 dias foi possível acompanhar o padrão de desenvolvimento sigmoidal dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa*, com 5 estádios de desenvolvimento, variação de diâmetro de 27,42mm e comportamento climatérico. O estádio I foi considerado a fase de pré-antese da flor. No estádio II, com duração média de 30 dias, os frutos apresentaram coloração verde e sépalas persistentes. A fecundação se deu no terceiro dia após a polinização e a embriogênese foi detectada no quinto dia, com a formação do zigoto, com suspensores bem desenvolvidos, formação do endosperma nuclear, presença do nucelo e da testa na semente. No décimo dia os embriões se encontravam no estádio globular e o endosperma apresentou celularização. O estádio embrionário cordiforme ocorreu antes de 15 dias e, aos vinte dias o embrião se encontrava na fase de torpedo, evoluindo até o trigésimo dia para sua forma mirtoide definitiva. Neste período as sementes se desenvolveram envoltas pela parede interna ovariana com glândulas de óleo, sem que houvesse o concrecimento entre esta estrutura e a testa seminal, podendo-se extrair facilmente os embriões de dentro dos frutos. No estádio III, com duração média de uma semana, os frutos e os embriões aumentaram rapidamente em diâmetro, a testa das sementes iniciou o concrecimento com a parede interna ovariana e a coloração variou para amarelo-esverdeado. O estádio IV se caracterizou pelo amadurecimento pleno, com variação de cor para o alaranjado, máximo diâmetro (30,21mm), máximo desenvolvimento dos embriões e o concrecimento da testa com a parede interna ovariana na maioria das sementes. O estádio V marcou o início da senescência pela intensificação da cor laranja e a diminuição do diâmetro dos frutos. Os frutos maduros são bagas alaranjadas do tipo campomanesoídeo, com sépalas persistentes, pericarpo dividido em 3 regiões, glândulas de óleo na região interna e na região externa do pericarpo, abaixo da epiderme estomatífera e coberta por tricomas. A região mediana do pericarpo apresenta vascularização intensa, células longas e expandidas e esclereídes que fazem a sustentação do tecido. As sementes são cobertas por mucilagem oriunda da polpa e pela região interna do pericarpo rico em glândulas de óleo que concrecem com o tegumento das sementes. São formadas pela testa cartilaginosa bitementada, apresentam hipóstase bem desenvolvida e são exalbuminosas. Os embriões são tipicamente mirtoídes, formados pelo eixo hipocotilo-radicular engrossado e por cotilédones pequenos. Apresentam a radícula livre e não apresentam estruturas secretoras.

INTRODUÇÃO

A definição de fruto vem evoluindo à medida que as análises estruturais do gineceu se intensificam. Cave (1869) classificou os frutos como uma folha, mais ou menos modificada, quando ele provém de um ovário superior; quando ele provém de ovários ínferos, podem estar envolvidos na formação dos frutos, tecidos de origem receptacular e do perianto (MAUSETH, 1988). Classicamente, os frutos são considerados como o ovário fecundado, desenvolvido e amadurecido. Barroso *et al.* (1999) estabelecem que o fruto é a estrutura que representa o último estágio de desenvolvimento do gineceu fecundado ou partenocárpico. Para Souza (2006), é o resultado de ovário ou ovários desenvolvidos e em estado de maturação, podendo-se agregar a ele outras partes da flor ou mesmo de inflorescência.

Um dos requisitos para o desenvolvimento dos frutos é a fecundação. Mariath *et al.* (2006) definem fecundação como a aproximação dos dois gametas do andrófito aos dois gametas do ginófito. Os autores dividem este processo em polinização, acoplamento, cópula, descarga dos gametas e singamia. Ainda segundo Mariath *et al.* (2006), a singamia é a última etapa da fecundação e compreende a fusão de um gameta com a oosfera para formar o zigoto esporofítico (diplóide) e de outro gameta com a célula média para formar o endosperma (em geral triploide). Para Souza (2003), a dupla fecundação, evento que ocorre nas Angiospermae, inicia com transformações estruturais, fisiológicas e bioquímicas nos ovários e nos óvulos, as quais levam à formação da parede do fruto (pericarpo) e formação das sementes, respectivamente.

O entendimento de que os frutos só iniciam seu desenvolvimento a partir da fecundação não é correto, uma vez que os tecidos formadores do fruto derivam de células que se formam no primórdio floral (NITSCH, 1953). Como esclarece Souza (2009), a análise de desenvolvimento dos frutos inclui o ovário das flores em pré-antese (fase balão). A literatura registra muitos estudos de desenvolvimento de frutos. Entre estes podem ser citados os trabalhos clássicos de Nitsch (1953) com espécies de Cucurbitaceae, tomate, maçã, de Souza *et al.* (1984, 1993) com *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. e *Acacia paniculata* Willd., de Oliveira (1991), com *Inga fagifolia* G. Don e *Inga uruguensis* Hook. & Arn., e de Barros (2002) com *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.

Segundo Souza (2006), o estudo de frutos e sementes é essencial na preservação de espécies, na colonização de novos ambientes, no

controle de plantas invasoras, no reflorestamento, na silvicultura, na investigação de plantas medicinais e tóxicas e em muitos outros campos de aplicação botânica. Este período do processo reprodutivo é fundamental no ciclo biológico das plantas.

Além disso, conhecer os estádios de desenvolvimento de frutos é importante na hora de tomar decisões em relação ao manejo em sistemas de produção, pois permitem detectar os momentos críticos para ocorrência de estresses bióticos ou abióticos. A avaliação do padrão de desenvolvimento de um fruto a partir do florescimento auxilia no estabelecimento de índices de maturidade (COOMBE, 1976). O estágio de desenvolvimento dos frutos no momento da colheita tem influência na qualidade do fruto maduro e um dos índices mais utilizados na determinação do ponto de colheita é o número de dias desde a floração até o desenvolvimento pleno do fruto (WARRINGTON *et al.*, 1999).

Estas informações não foram encontradas para *Campomanesia xanthocarpa*, o que determinou os estudos acerca do desenvolvimento estrutural de embriões, sementes e frutos desta espécie.

1. METODOLOGIA

1.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES

- Coleta de Material Vegetal:

A coleta de ramos florais e de frutos polinizados em S1, bem como a coleta de botões florais de indivíduos S2, S3 e S4, foi realizada em plantas ocorrentes em áreas remanescentes de mata nativa, no Estado de Santa Catarina, no interior do município de Alfredo Wagner, latitude 27°42'01", longitude 49°20'01", altitude 480m, distante 111Km de Florianópolis (capital do estado).

- Análises Laboratoriais:

Foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), do Departamento de Fitotecnia, integrado ao Centro de Ciências Agrárias; no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG) do Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

1.2 – COLETA DE RAMOS E DE BOTÕES FLORAIS DE *C. XANTHOCARPA*

Foram coletados 4 ramos florais de 1,5m de comprimento, de uma árvore adulta de *C. xanthocarpa* (matriz S1) (Figuras 1A e 1B), com botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. O material vegetal foi acondicionado em baldes plásticos contendo água (adaptado de FRANZON, 2008) para transporte e manutenção durante 10 dias no laboratório. Botões florais de indivíduos S2, S3 e S4, na fase balão de desenvolvimento, foram separados em sacos de papel, identificados e colocados em caixa de isopor com gelo para posterior transporte (Figura 1C).

1.3 – POLINIZAÇÃO CRUZADA CONTROLADA EM *C. XANTHOCARPA*

Para estudar o desenvolvimento dos frutos de *C. xanthocarpa*, procedeu-se à polinização cruzada controlada, atuando como agentes transportadores dos andrófitos das anteras para os estigmas das flores,

de modo a assegurar que o acoplamento, a cópula e a consequente singamia ocorreriam cerca de 72 horas depois da polinização.

Em laboratório, foram retiradas as anteras dos botões florais oriundos dos indivíduos S2, S3 e S4, as quais foram colocadas a secar sobre papel absorvente em condições de temperatura ambiente, em local fresco e abrigado, por 24 horas para liberação dos grãos de pólen. Após a liberação, o material foi armazenado em tubos “ependorf” de 5mL sendo, então, identificados e acondicionados em tubos “falcon” de 20mL, com sílica gel e colocados sob refrigeração a 7°C, por 24 horas, para uso na polinização cruzada controlada (adaptado de FRANZON *et al.*, 2006).

Nos ramos floríferos acondicionados em baldes plásticos com água, foram escolhidos 120 botões florais na fase de pré-antese (fase balão) para a polinização cruzada controlada. Foram retiradas as pétalas e os estames (anteras e filetes) e realizadas as polinizações com a mistura de pólen (S2, S3 e S4), sendo os pólenes colocados diretamente sobre o estigma das flores emasculadas que foram marcadas com fitas coloridas (Figura 1D, 1E e 1F). No indivíduo S1 também foram realizadas polinizações cruzadas controladas, em 120 botões florais, na fase balão, utilizando a mistura de polens S2, S3 e S4, sendo os botões florais marcados com fitas (Figuras 1A e 1G). Tanto em laboratório quanto no indivíduo S1, foram deixados 15 botões florais sem polinizar. As coletas foram realizadas a intervalos de tempo pré-determinados conforme a Tabela 1 (adaptado de FRANZON *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Intervalos de tempo (em horas) para coleta e quantidade de botões florais de *C. xanthocarpa*, submetidos à polinização cruzada controlada em cada tempo:

Tempo de coleta	Número de botões florais (laboratório)	Número de botões florais (indivíduo S1)
AP*	15	15
72h, 96h, 120h, 144h, 168h, 192h, 216h e 240hDP**	15 x 8 = 120	-
240h, 360h, 480h, 600h, 720h, 888h, 936h e 1008hDP	-	15 x 8 = 120
Total de botões florais utilizados		270

*AP = antes da polinização **DP = depois da polinização

1.4 - COLETA DE FRUTOS E EXTRAÇÃO DE SEMENTES E EMBRIÕES ORIUNDOS DA POLINIZAÇÃO CRUZADA CONTROLADA EM *C. XANTHOCARPA*

Após 72 horas da polinização cruzada controlada, os tubos polínicos atingiram a micrópila dos óvulos e isto determinou o início das coletas nos ramos acondicionados em laboratório, até 10 dias depois das polinizações (DP). Na matriz S1, as coletas iniciaram 10 dias DP, prolongando-se por 42 dias DP, conforme os intervalos de tempo contidos na Tabela 1. Parte dos frutos oriundos da polinização cruzada controlada, em S1 (10 frutos em cada tempo), foi coletada *in natura* e transportada em isopor, com gelo, até o laboratório (Figura 1H). A mesma metodologia foi aplicada ao material polinizado no laboratório. O restante do material polinizado (5 frutos em cada tempo) foi colocado em tubos “falcon” de 15mL contendo solução de fixação de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,2M - pH 7,3. O material colocado em fixador foi submetido ao vácuo, por 4 horas. Depois, foi lavado com tampão fosfato, diluído em água destilada na proporção de 1:1. Foram realizadas duas lavagens de 15 minutos cada neste tampão (McDowell & Trump, 1976). Posteriormente, este material foi desidratado em série etanólica crescente, iniciando com álcool 10%, com duplas lavagens de 15 minutos cada, passando para álcool 20%, 30%, 40%, 50%, 60% até 70%, com duplas lavagens de 15 minutos em cada álcool. O material assim desidratado foi guardado em geladeira até o momento de ser preparado para microscopia óptica ou para microscopia eletrônica de varredura (Figuras 1I e 1J).

As sementes e embriões foram extraídos dos frutos, em diferentes estádios de desenvolvimento. As sementes foram beneficiadas, sendo que a operação de beneficiamento consistiu na colocação da polpa dos frutos em peneiras, com enxágue abundante em água corrente, até a remoção das estruturas que as envolviam.

1.5 - ANÁLISE ESTRUTURAL DE EMBRIÕES, SEMENTES E FRUTOS DE *C. XANTHOCARPA*

Os frutos *in natura*, em diferentes estádios de desenvolvimento (Tabela 1) foram analisados morfológicamente, sob o microscópio estereoscópio, e medidos com paquímetro graduado em milímetros, na região mediana dos frutos, a intervalos de cinco dias (adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2011). Os dados dos tamanhos dos frutos foram submetidos aos testes de normalidade e de igualdade de variâncias e à

análise de variância (ANOVA). Para a análise estrutural, os frutos recém coletados foram seccionados transversal e longitudinalmente, à mão livre com gilete e colocados sobre lâminas histológicas, sendo corados com sudan III e floroglucinol acidificado.

Os frutos coletados conforme a Tabela 1, fixados e desidratados, foram infiltrados com historesina (Leica®), sendo colocados em solução de pré-infiltração (historesina: etanol 95%, 1:1, v/v), durante 24 horas, sob vácuo, e, em seguida, transferidos para a solução de infiltração (historesina pura), por quatro horas, sob vácuo. A seguir, foram colocados em moldes que continham a solução de inclusão (historesina adicionada de endurecedor). As secções foram feitas em micrótomo de rotação, distendidas em lâminas histológicas e submetidas à coloração com azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1964). Os registros fotográficos e as análises foram realizados em microscópio óptico Olympus DP40F, com unidade de controle DP, Control 71 da Olympus e câmara fotográfica acoplada ou sob microscópio estereoscópio Olympus SZH10, com unidade de controle DP, Control 71 da Olympus e câmara fotográfica acoplada (Figura 1I).

A análise ultraestrutural de superfície, em microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi realizada em amostras retiradas de cinco botões florais, de cada estágio de desenvolvimento. As amostras, previamente fixadas e conservadas em etanol 70%, como descrito acima, foram desidratadas em série etílica crescente até etanol 100% para a obtenção das secções transversais e longitudinais. As secções foram colocadas em tubos eppendorfs, contendo etanol 100%, por 30 minutos, e, posteriormente, foram submetidas ao ponto crítico de CO₂ Leica EM CPD 030, seguindo procedimento de Horridge & Tamm (1969). Depois da secagem, o material foi aderido sobre suportes de alumínio, com auxílio de uma fita carbono dupla-face e numerado conforme planejamento prévio. Estes suportes foram postos sobre isopor, numa caixa plástica transparente contendo sílica gel. A caixa foi vedada com PVC e colocada dentro de um desumidificador até ser coberto com 20nm de ouro, em metalizador Leica EM CPD 030, modelo CPD 030. A análise e documentação foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV (Figura 1J).

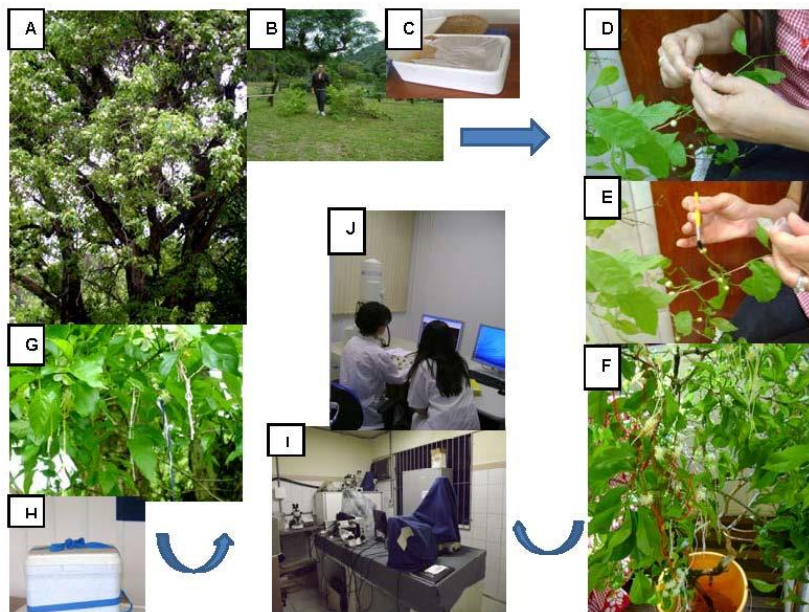


Figura 1 - Metodologias utilizadas para análise estrutural de frutos, sementes e embriões de *C. xanthocarpa*. **A)** Indivíduo S1. **B)** Ramos floríferos retirados de S1. **C)** Acondicionamento para transporte de estames (indivíduos S2, S3 e S4) usados na polinização cruzada controlada. **D e E)** Emasculação dos botões florais e polinização cruzada manual em ambiente controlado. **F)** Ramos com botões florais polinizados e marcados com fitas coloridas, acondicionados em baldes contendo água. **G)** Ramos de S1 (à campo) marcados com fitas coloridas, após a polinização cruzada controlada. **H)** Acondicionamento para transporte de frutos oriundos da polinização cruzada controlada em S1. **I)** Sala de microscopia, no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV/UFSC). **J)** Sala de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC).

2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 – ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS DE *C. XANTHOCARPA*

Para *C. xanthocarpa*, optou-se por incluir a fase de pré-antese na análise de desenvolvimento, acompanhando os demais estádios a partir da polinização cruzada controlada. Na fase balão, o ovário desta espécie apresentou uma parte superior, ligada ao estilete, mais elevada, seis a oito lóculos com rudimentos seminais bisseriados, epiderme externa fortemente cutinizada e recoberta por tricomas. O mesofilo mostrou-se constituído por tecido parenquimático e os feixes vasculares estavam entremeados a este tecido. Estruturas secretoras foram registradas no mesofilo, sob a epiderme (Seção II deste trabalho). No terceiro dia depois da polinização (72h DP), ocorre a fecundação da oosfera (Seção III deste trabalho), com o desenvolvimento dos frutos estendendo-se por cerca de, 45 dias. O diâmetro médio e a coloração alteraram-se visivelmente ao longo do tempo, variando de 2,79mm e coloração esverdeada até 30,21mm e coloração alaranjada. Durante cerca de 30 dias, o desenvolvimento dos frutos apresentou uma evolução lenta e constante, variando de 2,79mm até 17,48mm de diâmetro, com a manutenção da coloração esverdeada. De 30 a 37 dias constatou-se uma variação de cerca de 10mm no diâmetro dos frutos, passando de 17,48mm para 26,97mm e a cor verde que foi substituída pelo laranja-esverdeado. Em dois dias (aos 39 dias), houve um aumento médio de cerca de 3mm no diâmetro dos frutos (de 26,97 para 30,21mm) e a mudança para a coloração alaranjada, no estágio final de amadurecimento. A senescência intensificou-se a partir de 42 dias depois da polinização, com o aumento de intensidade da coloração laranja, quando teve início a redução no diâmetro médio, que passou para 28,93mm, eventos que culminaram com a queda dos frutos. Estes dados estão sumarizados na Tabela 2.

A partir destas observações, foi possível dividir o desenvolvimento dos frutos em 5 estádios, dentro de um padrão sigmoidal (Figura 2). O estágio I (Figura 2A) foi representado pelo ovário das flores na fase balão. O estágio II (Figuras 2B a 2G) foi identificado pelo lento desenvolvimento inicial logarítmico até 30 dias DP, provavelmente ligado à divisão, expansão celular e diferenciação dos tecidos. No estágio III (entre 30 e 37 dias DP; Figuras 2G e 2H, respectivamente) ocorreu um incremento exponencial no desenvolvimento dos frutos de *C. xanthocarpa*, através do crescimento

dos embriões, desenvolvimento das sementes, crescimento do pericarpo e início da maturação. No final deste período, a coloração verde intensa foi substituída parcialmente pelo laranja (Figura 2H). O estágio IV (Figura 2I) foi identificado pela desaceleração do desenvolvimento até 39 dias DP, com o processo de amadurecimento dos frutos, caracterizado pela mudança da coloração verde para o alaranjado, e pelas mudanças nos padrões sensoriais, sendo o melhor momento para o consumo *in natura* da fruta. O estágio V de desenvolvimento (Figura 2J) envolveu a fase de senescência e degradação até 42 dias DP, com diminuição do diâmetro médio e abscisão dos frutos.

O aumento no tamanho do fruto é proporcionado pelo aumento do número e tamanho das células, as quais, com o crescimento, vão formando vacúolos e acumulando de carboidratos e outros compostos (GORTNER *et al.*, 1967). Em geral, a divisão celular está restrita a primeira e segunda fase do desenvolvimento, podendo ser de curta duração, para alguns frutos, como o tomate (HULME, 1970; AWAD, 1993), ou prolongar-se por várias semanas, como em carambola (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). A expansão celular, por outro lado, pode continuar até a maturidade (GORTNER *et al.*, 1967). Salomão *et al.* (2006) constataram que o aumento nos frutos de lichieira (*Litch chinensis* Sonn.) até o 77º dia foi devido, basicamente, ao crescimento do pericarpo e da semente. Nesse período, pericarpo e semente, juntos, representavam 87% da massa da matéria seca do fruto. Em ciriguela (*Spondias purpurea* L.) a fase de crescimento mais intenso foi caracterizada pelo aumento do volume dos frutos, acompanhado pela pigmentação verde-intensa, características estas indicativas da atividade celular máxima, refletida pela imaturidade fisiológica (MARTINS *et al.*, 2003). Chitarra & Chitarra (2005) referem o controle destas etapas à ação de fitormônios como auxinas, citocininas e giberilinas, que retardam o amadurecimento e estimulam a divisão e expansão celulares. Na fase de amadurecimento, os frutos de ciriguela, já haviam completado o desenvolvimento e atingido a máxima qualidade comestível, caracterizada por profundas modificações na textura e nos pigmentos, refletida pela transição da cor verde-escura para vermelho-escura (MARTINS *et al.* 2003). As mudanças de cor estão relacionadas à degradação da clorofila durante o amadurecimento, evidenciando outros pigmentos contidos nas células, como os carotenos e xantofilas. O controle do amadurecimento está relacionado ao incremento nos teores de ácido abscísico e um aumento na atividade das hidrolases, estimulando a síntese autocatalítica do etileno (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

Martins *et al.* (2003) registraram, no amadurecimento de ciriguela, sinais de enfraquecimento da camada de abscisão do pecíolo como preparação para a liberação do fruto da planta. A queda de frutos pode estar relacionada à menor presença de feixes vasculares nos pedicelos, o que reduziria a chegada de nutrientes, fotoassimilados e reguladores de crescimento para o fruto, impedindo seu desenvolvimento (ZHANG, 1997). Durante a senescência, predominam os processos catabólicos que levam à degradação do órgão vegetal. Pode ser resultante do corte do fornecimento de nutrientes levando à utilização de reservas acumuladas nos tecidos para manter a homeostase celular e a integridade das membranas. Etileno e ácido abscísico estão intimamente envolvidos neste processo que culmina com a morte celular programada (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

Tabela 2 - Tempos de coletas de flores em antese (diâmetro médio dos ovários em mm) e frutos correlacionados a uma escala de tamanhos (diâmetro em milímetros) após a polinização cruzada controlada de *C. xanthocarpa*

Dias/horas da polinização	Diâmetro médio do ovário (AP) e dos frutos (mm)
Antese (AP*)	2,79a
5 dias (120h DP**)	6,32b
10 dias (240h DP)	8,81b
15 dias (360h DP)	10,26bc
20 dias (480h DP)	12,43c
25 dias (600h DP)	14,24cd
30 dias (720h DP)	17,48d
37 dias (888h DP)	26,97e
39 dias (936h DP)	30,21f
42 dias (1008h DP)	28,73f

*AP = antes da polinização **DP = depois da polinização

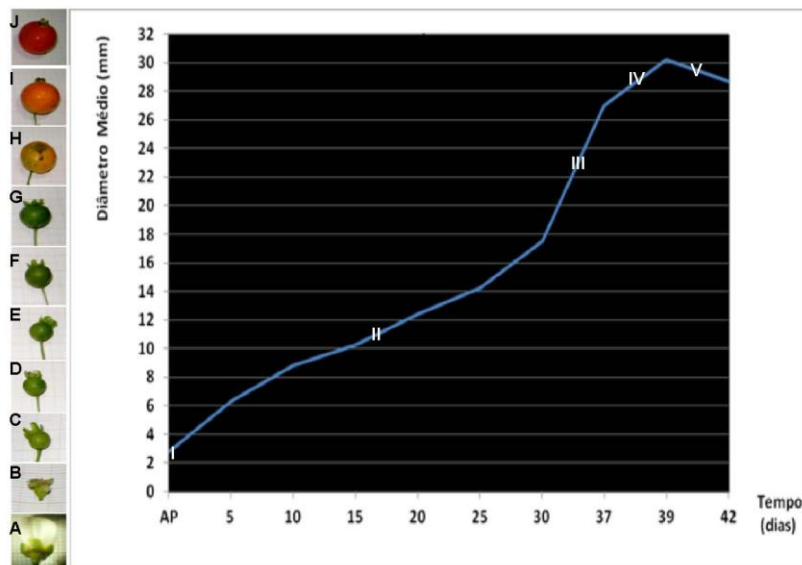


Figura 2 - Padrão sigmoidal de desenvolvimento dos frutos de *C. xanthocarpa*. A) Fase balão (ovário com 3mm de diâmetro). B) Frutos de coloração verde (5 dias DP; 6mm). C) Coloração verde (10 dias DP; 9mm). D) Frutos verdes (15 dias DP; 10mm). E) Frutos verdes (20 dias DP; 12mm). F) Frutos verdes (25 dias DP; 14mm). G) Frutos verdes (30 dias DP; 17mm). H) Frutos verde-alaranjados (37 dias DP; 27mm). I) Frutos alaranjados (39 dias DP; 30mm). J) Intensificação da coloração laranja dos frutos (42 dias DP; 29mm). I, II, III, IV, V = estádios de desenvolvimento.

2.2 – DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DE EMBRIÕES E SEMENTES CORRELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS DE *C. XANTHOCARPA*

Uma vez estabelecidos os estádios de desenvolvimento dos frutos, estes foram relacionados com o desenvolvimento das sementes e embriões. A fase II caracterizou-se pelo desenvolvimento lento das estruturas, ao longo de 30 dias depois da polinização cruzada controlada. A partir do décimo dia foi possível detectar mudanças na forma dos frutos, sementes e embriões, observados sob o microscópio estereoscópio. Ao longo dos 30 dias, os frutos globosos de cor verde mantiveram as sépalas firmemente aderidas e foi possível distinguir a parte superior do fruto em desenvolvimento com o que havia restado do estilete (Figuras 3A1, 3B1, 3C1 e 3D1). Neste período, as sementes

desenvolveram-se envoltas pela parede do fruto jovem constituída por glândulas de óleo. Aos 10 dias, a cobertura formada pela parede interna do fruto (Figura 3A2) mostrou-se mais ampla do que as sementes que se encontravam no seu interior, permitindo o desenvolvimento gradual das estruturas seminais e embrionárias (Figuras 3B2, 3C2 e 3D2). Nesta fase, a extração das sementes era facilitada, bastando uma pressão leve sobre o ovário em desenvolvimento. Aos 10 dias, as sementes podiam ser facilmente liberadas. Estas mostraram-se formadas pela testa envolvendo os embriões globulares (Figura 3A3 e 3A4), menores que 0,5mm. Aos 15 dias, os embriões desprendiam-se facilmente da testa, os quais denotavam um período de transição entre a fase cordiforme e a de torpedo (Figuras 3B3 e 3B4), com cerca de 1,5mm de comprimento. Aos 20 dias, ao se fazer pressão sobre os frutos, eram liberados somente os embriões, os quais já se encontravam na fase de torpedo (Figuras 3C3 e 3C4), com cerca de 3mm de diâmetro, ficando a testa das sementes aderida no interior dos frutos (Figura 3C3). Aos 30 dias, os embriões, com cerca de 4mm, eram liberados com facilidade, apresentando o formato reniforme característico (Figuras 3D3 e 3D4).

Na fase III de desenvolvimento, houve o incremento do desenvolvimento dos frutos em diâmetro e o início perceptível do amadurecimento devido à mudança de coloração do verde para o amarelo esverdeado (Figura 3E1). Este incremento em diâmetro, no período de uma semana, provavelmente está ligado ao desenvolvimento dos tecidos do pericarpo (Figura 3E2), uma vez que as estruturas seminais e embrionárias não variaram significativamente em tamanho ou forma. Os embriões (Figuras 3E3 e 3E4) exibiram forma semelhante à fase anterior, com cerca de 4,5mm de diâmetro, facilmente liberados através da pressão sobre os frutos, com extravasamento sobre eles das secreções das glândulas de óleo da parede interna.

A fase IV caracterizou-se pela intensificação da coloração alaranjada dos frutos (Figura 3F1) e pela finalização da estrutura embrionária com cerca de 5mm de diâmetro. A parede interna locular (Figura 3F2) mostrou-se firmemente aderida às estruturas seminais, possibilitando fácil liberação do embrião (Figura 3F3). Constatou-se, ainda, um aumento no volume de secreções glandulares liberadas sobre os embriões, estes se mostrando mais espiralizados (Figura 3F4).

A formação do embrião em Magnoliopsida compreende uma fase proembrionária, divisão do zigoto até os primórdios dos cotilédones, e uma fase embrionária, que inicia com o embrião cordiforme até a sua formação final (SOUZA, 2009). Barroso *et al.* (1991) esclarecem que o embrião das sementes de Myrtaceae serve como base para a

classificação desta família em tribos, diferenciando-os em embriões mircioides, pimentoides e eugenioides. Estes autores complementam informando que em *Campomanesia* são encontrados embriões enrolados em espiral, formados pelo eixo hipocótilo-radicular, em cujo ápice se localizam os cotilédones rudimentares, constituindo a forma especializada do embrião pimentoide. Coneglian (2007), trabalhando com sementes de *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg não conseguiu registrar os cotilédones anatomicamente, atribuindo este fato ao tamanho reduzido de tais órgãos.

Pode-se perceber que as fases de desenvolvimento mais intenso dos frutos nem sempre correspondem as do desenvolvimento mais intenso das sementes e embriões. A maior diferença, em termos de tamanhos e formas, foi verificada na fase III de desenvolvimento para os frutos, enquanto o período de diferenciação e crescimento mais intensos, nas estruturas seminais e embrionárias, deu-se nos últimos 10 dias da fase II de desenvolvimento dos frutos. *Campomanesia xanthocarpa* investe inicialmente na formação e na proteção dos ginófitos, através da formação da testa e da cobertura das sementes pela parede interna locular, a qual mostrou-se rica em glândulas de óleos e fenóis, com provável função de defesa ao ataque de patógenos e/ou predadores, garantindo assim sua perpetuação na natureza. Num segundo momento, a espécie investe no aprimoramento dos frutos como estruturas de proteção e dispersão das sementes. Aos 39 dias, o fruto mostrou evidências indicativas do pleno amadurecimento do pericarpo, bem como do embrião neste contido. Estas informações tornam-se importantes na tomada de decisões acerca dos melhores momentos para coleta de frutos para consumo *in natura* ou para uso industrial, de embriões empregados na micropropagação ou da coleta de sementes para produção de mudas.

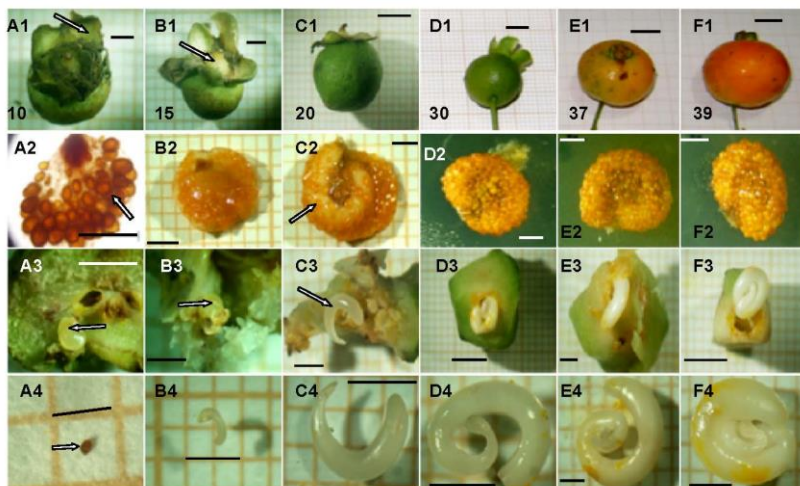


Figura 3 - Estádios de desenvolvimento dos frutos, sementes e embriões de *C. xanthocarpa*: A1-A4) Frutos verdes 10 dias DP, apresentando sépalas persistentes (seta em A1), com sementes se desenvolvendo envolvidas pela parede locular interna glandular (seta em A2), com liberação da testa seminal (seta em A3) contendo o embrião globular (seta em A4). B1-B4) Frutos verdes 15 dias DP, com sépalas presentes envolvendo a parte superior do ovário em desenvolvimento (seta em B1) e estruturas seminais envolvidas pela parede do fruto (B2), liberando a testa (seta em B3) com embriões em fase transicional, entre a fase cordiforme e a fase de torpedão (B4). C1-C4) Frutos verdes 20 dias DP, com sépalas presentes (C1) e aumento de diâmetro, apresentando a semente em desenvolvimento dentro da proteção da parede glandular (seta em C2), liberando embriões na fase de torpedão (seta em C3 e detalhe do embrião em C4). D1-D4) Frutos verdes 30 dias DP com sépalas bem visíveis (D1) e estruturas seminais completamente cobertas pela parede interna do fruto (D2), liberando embriões (D3) em início de espiralização (D4); E1-E4) Frutos de coloração amarelo-esverdeada 37 dias DP (D1), evidenciando degradação da clorofila, parede interna (E2) parcialmente aderida às sementes no seu interior, liberando embriões espiralizados (E3 e E4). F1-F4) Frutos maduros 39 dias DP, com coloração alaranjada (F1), com sementes envoltas pela parede locular (F2), liberando embriões completamente espiralizados (F3 e F4). Barras = 1mm (A2, A3, A4), 2mm (A1, B1, B2, B3, B4, C2, C3, C4, D4, E3, E4, F4), 5mm (C1, D1, D3, F3), 10mm (E1, F1), 100 μ m (D2, E2, F2).

2.3 – ANÁLISE ESTRUTURAL DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES E SEMENTES CORRELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS DE *C. XANTHOCARPA*

2.3.1 – Análise estrutural aos cinco dias após a polinização cruzada

Depois de cinco dias da polinização cruzada controlada, em *C. xanthocarpa*, os botões florais de coloração verde apresentavam desenvolvimento perceptível da região ovariana, sépalas persistentes e restos da porção basal do estilete (Figura 4A), cujos tecidos entraram em senescência e morte após a fecundação. As secções dos ovários em desenvolvimento, sob a microscopia óptica, revelaram os proembriões com seus respectivos suspensores. Foi possível distinguir a testa, a região nucelar e o saco embrionário, envolvendo a porção apical dos proembriões voltada para o endosperma nuclear, em início de formação. Pode-se visualizar a parede interna do fruto unitegumentada cercando as cavidades loculares ainda não concrecidas com a testa das sementes (Figuras 4B e 4C). Na figura 4C, uma parte da testa mostrou-se concrecida com o tegumento interno do fruto. A microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização da testa e da região nucelar, não sendo possível distinguir os proembriões (Figura 4D). No quinto dia depois da polinização controlada, *C. xanthocarpa* apresentou proembriões com seus suspensores bem desenvolvidos (Figura 4B), envoltos em camadas protetoras, como a testa. Tecidos nutritivos, como o endosperma nuclear, que parece ter iniciado sua formação antes dos proembriões, devido ao aspecto bem desenvolvido, e a camada espessa do nucelo garantem o início da expressão da programação genética que leva ao desenvolvimento da nova geração esporofítica.

Após a fecundação, conforme referem Mariaht *et al.* (2006), a célula média dá origem à geração xenofítica (em geral um tecido de reserva), responsável pela nutrição do embrião esporofítico originado a partir da fusão de um gameta do andrófita com a oosfera, gerando um zigoto esporofítico (diploide). Os autores esclarecem que o embrião corresponde à fase inicial da ontogenia do esporófito, culminando com a germinação da semente. A embriogênese inicia a partir da fecundação e, através de mitoses sucessivas, origina a nova geração esporofítica.

Ainda, segundo Mariath *et al.* (2006), as primeiras divisões celulares embriogênicas resultam na formação de um proembrião, constituído por um aglomerado de células na extremidade apical, projetada na direção da célula-média fecundada ou do endosperma em início de formação, e por um grupo de células basais que formam um

filamento chamado suspensor, voltado para o canal micropilar. Além de manter o embrião numa posição fixa, estudos ultraestruturais, bioquímicos e fisiológicos indicam que o suspensor tem papel ativo na embriogênese inicial e no desenvolvimento embrionário, além de funcionar como translocador de substâncias nutritivas dos tegumentos para o embrião (YEUNG & MEINK, 1993).

O endosperma desenvolve-se a partir da fusão do gameta do andrófito com a célula central ou média, sendo considerado nuclear quando o núcleo primário do endosperma, resultante da singamia, divide-se inúmeras vezes, sem formar a parede celular. Os núcleos permanecem livres na cavidade onde se aloja o embrião, mais tarde ocorrendo a celularização (SOUZA, 2009). O endosperma nuclear é encontrado em muitas espécies, incluindo as da família Myrtaceae. Coneglian (2007), trabalhando com *Myrcia bella* Cambess. e *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg observou a formação deste tipo de endosperma logo após a antese, o que também foi constatado em *C. xanthocarpa* (Figura 4B).

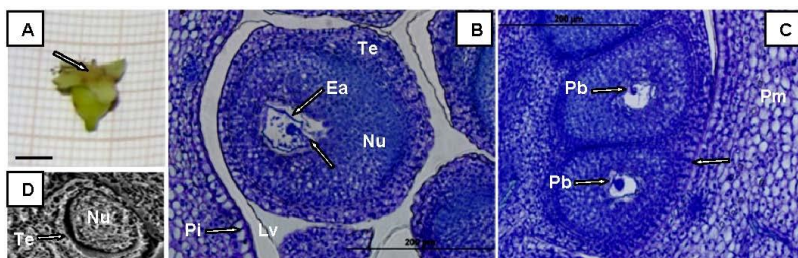


Figura 4 - Fruto, sementes e embriões de *C. xanthocarpa* cinco dias (120h DP), após a polinização cruzada controlada. **A)** Fruto verde com início de desenvolvimento do ovário, apresentando sépalas persistentes e o que restou da base do estilete na inserção, com o início da porção superior do ovário (seta). **B)** Secção longitudinal do fruto, mostrando o início da formação da semente, com a presença de testa, região nucelar, envolvendo o saco embrionário, e proembrião sustentado pelo suspensor (seta), cuja região apical volta-se para o endosperma nuclear. Nota-se que a parede interna unitegumentada do fruto, que delimita o lóculo da cavidade, não se encontra condescida com a testa seminal. **C)** Presença de proembriões desenvolvendo-se em sementes, cujas testas encontram-se condescidas com a parede interna (seta) e periderme do fruto em desenvolvimento. **D)** Eletromicrografia da semente em formação mostrando a testa e a região nucelar. Barra = 2mm (A). Te = testa, Nu = nucelo, Ea = endosperma nuclear, Lv= lóculo, Pi = parede interna, Pb = proembrião, Pm = pericarpo.

2.3.2 – Análise estrutural aos dez dias após a polinização cruzada

Após dez dias da polinização controlada, os frutos de *C. xanthocarpa* apresentavam coloração verde, região ovariana desenvolvida e sépalas persistentes, com a cicatriz do estilete bem visível (Figura 5A). As microscopias óptica e eletrônica de varredura permitiram a visualização da testa bem desenvolvida e ainda não condescida à parede locular interna do fruto (Figuras 5B e 5D), formada pelo tegumento interno fortemente comprimido, um tegumento médio e um tegumento externo ou exotesta cujas células mostraram-se levemente alongadas no sentido radial (Figuras 5E e 5F). Nesta fase de desenvolvimento dos frutos de *C. xanthocarpa*, os embriões globulares alojados numa das extremidades do saco embrionário, circundados pelo endosperma nuclear que se encontrava em processo de celularização, foram facilmente identificados. O nucelo apresentou-se como uma camada menos espessa, circundando o saco embrionário, indicando que, provavelmente, as estruturas em desenvolvimento consumiram suas reservas (Figuras 5C, 5D e 5F).

Coneglian (2007) descreveu a estrutura das camadas formadoras da testa em *Campomanesia pubescens*, *Myrcia bella* e *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC., referindo-se às células alongadas da exotesta, com espessamentos secundários lignificados, células da mesotesta sem lignificação e comprimidas à medida que o embrião se desenvolvia e a forte compressão das células da camada interna, parecendo que as células não possuíam citoplasma. O uso de azul de toluidina nas amostras de *C. xanthocarpa* não indicaram presença de lignina na exotesta. Após uma série de divisões mitóticas, as células da extremidade terminal do proembrião originam uma massa esférica de células que é reconhecida como o estágio globular da ontogenia do embrião (MARIATH *et al.*, 2006). Pescador *et al.* (2009) relataram que *Acca sellowiana* apresentou endosperma do tipo nuclear e que sua formação iniciava-se antes da formação do zigoto, com o início da celularização durante a formação do embrião globular. Este padrão de formação do endosperma foi o mesmo encontrado para *C. xanthocarpa*. Em *M. bella* e *C. pubescens*, de acordo com Coneglian (2007), o endosperma começa a ser observado logo após a antese e também é formado de modo nuclear. Nas duas espécies, durante o desenvolvimento, o endosperma celulariza-se e é consumido na medida em que é produzido, sendo mais abundante em *C. pubescens*. O nucelo, complementa a autora, é consumido no processo de desenvolvimento das estruturas seminais e embrionárias nestas espécies.

Após dez dias da polinização estruturas importantes na formação das sementes e embriões são claramente visíveis, sendo este período marcado pela embriogênese propriamente dita e pelo maior desenvolvimento do endosperma e da testa, estruturas mantenedoras do embrião. Nota-se que *C. xanthocarpa* estruturou-se no sentido de garantir o pleno desenvolvimento das sementes e embriões, o que a torna uma espécie capaz de competir e se estabelecer nos ambientes onde é encontrada.

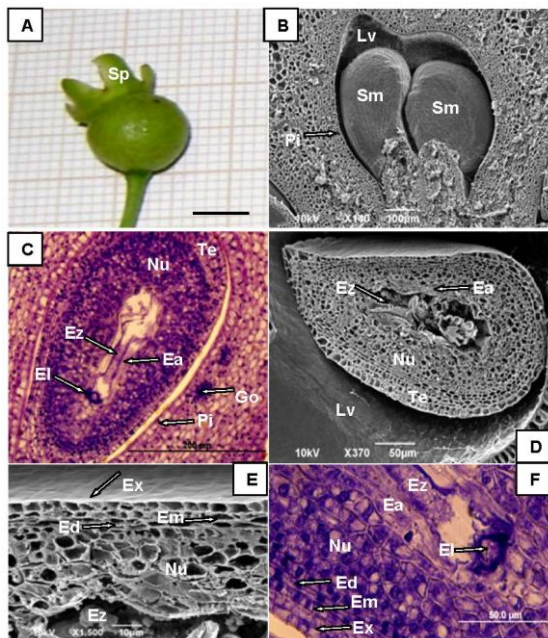


Figura 5 - Fruto, sementes e embriões de *C. xanthocarpa* dez dias (240h DP) após a polinização cruzada controlada. **A)** Fruto em desenvolvimento com sépalas persistentes. **B)** Eletromicrografia de varredura permitindo a visualização do lóculo com duas sementes em desenvolvimento. Tegumento externo (exotesta) não condescido à parede interna do fruto. **C)** Secção longitudinal do fruto mostrando a semente formada pela testa, o tegumento interno delimitando a região nucelar e o saco embrionário com o embrião globular circundado pelo endosperma nuclear em processo de celularização. Nota-se a parede locular unitegumentada com glândulas de óleo em formação, não condescida com a testa. **D)** Eletromicrografia de varredura mostrando secção transversal da semente, onde é possível observar as camadas formadoras da testa, a região nucelar e o saco embrionário com o endosperma nuclear e parte do endosperma em processo de celularização. **E)** Detalhe da secção seminal, em microscopia eletrônica de varredura, mostrando o endosperma em processo de celularização, o endosperma nuclear, o nucelo, a endotesta e a mesotesta comprimidas e a exotesta. **F)** Detalhe da secção longitudinal da semente mostrando o embrião globular, envolto pelo endosperma nuclear com regiões celularizadas, a camada menos espessa do nucelo, a endo e a mesotesta comprimidas e a exotesta com células mais alongadas. Barra = 2mm (A). Sp = sépala, Sm = semente, Lv = lóculo, Pi = parede interna do fruto, Nu = nucelo, El = embrião globular, Te = testa, Ez = endosperma celularizado, Ea = endosperma nuclear, Go = glândula de óleo, Ed = endotesta, Em = mesotesta, Ex = exotesta.

2.3.3 – Análise estrutural aos trinta e sete dias após a polinização cruzada

O trigésimo sétimo dia após a polinização cruzada marcou o início perceptível do amadurecimento dos frutos de *C. xanthocarpa*, evidenciado pela mudança na coloração externa de verde para amarelo-esverdeado. Ainda persistiam resquícios das sépalas envolvendo a cicatriz do que havia sido o estilete e a porção superior do ovário (Figura 6A). A microscopia eletrônica de varredura e a análise sob o microscópio estereoscópio permitiram a visualização do pericarpo desenvolvido e dos lóculos com as sementes em desenvolvimento. Foi possível perceber que, de um total de 7 a 9 óvulos potenciais por lóculo, somente 1 a 2 sementes desenvolveram-se ao lado de sementes abortadas (Figura 6B). Glândulas de óleo, adjacentes à parede interna do fruto, apresentaram-se envolvendo conspicuamente as sementes. A testa bem desenvolvida mostrou-se condescida com a parede interna, restando uma parte do endosperma contornando o embrião (Figura 6C). Mesmo condescida, a testa rompia-se com emprego de pressão sobre a região, liberando os embriões desenvolvidos, porém, estes ainda não estavam completamente espiralizados (Figuras 6F).

Em *Campomanesia pubescens*, Coneglian (2007) constatou que vários óvulos de cada lóculo começavam a desenvolver-se em sementes, mas nenhum ou apenas um por lóculo atingia o estágio de semente madura, sendo que os demais permaneciam como óvulos abortados nos lóculos sem semente ou nas proximidades de sementes em desenvolvimento. Segundo a autora, nesta espécie, bem como em *Myrcia bella* e *Eugenia punicifolia*, apenas um óvulo desenvolve-se em semente. Segundo Landrum (1982), o aborto é iniciado pela planta-mãe no intuito de concentrar recursos para o desenvolvimento de um óvulo em semente. Assim, *C. xanthocarpa* também deve apresentar óvulos abortados como forma de concentrar esforços para o bom desenvolvimento de algumas sementes.

As glândulas de óleo são frequentes entre as Myrtaceae, sendo relatada em diversos órgãos de espécies desta família (JUDD *et al.* 1999). Pescador *et al.* (2009), trabalhando com *Acca sellowiana* relatou que o endosperma persistia somente até o estágio de torpedão, o que não se verificou em *C. xanthocarpa*.

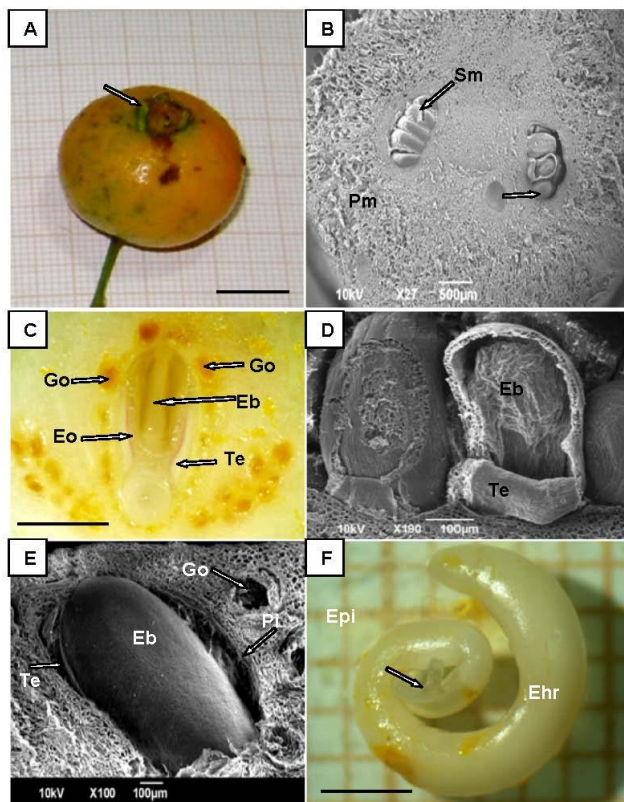


Figura 6 - Fruto, semente e embriões de *C. xanthocarpa* trinta e sete dias (840hDP) após a polinização cruzada controlada. **A)** Fruto amarelo-esverdeado, com pericarpo desenvolvido, mostrando resquícios das sépalas na região superior do fruto (seta). **B)** Eletromicrografia de secção transversal do fruto mostrando o pericarpo bem desenvolvido e os lóculos com sementes seriadas desenvolvendo-se ao lado de óvulos abortados (seta). **C)** Secção longitudinal mostrando as glândulas de óleo ao redor dos lóculos contendo a semente constituída por testa, endosperma e embrião. **D)** Detalhe, em microscopia eletrônica de varredura, de secção longitudinal na semente, cuja a testa foi removida, mostrando o endosperma e o embrião. **E)** Eletromicrografia mostrando a extrusão do embrião, com a permanência da testa (seta) aderida à cavidade interna glandular. **F)** Embrião pimentóide, parcialmente espiralado, formado pelo eixo hipocótilo-radicular, com cotilédones rudimentares no ápice (seta). Barras = 10mm (A), 2mm (C, F). Sm = semente, Pm = pericarpo, Go = glândula de óleo, Te = testa, Eo = endosperma, Eb = embrião, Pi = Parede interna, Epi = embrião pimentóide, Ehr = eixo hipocótilo-radicular.

2.3.4 – Análise estrutural do fruto maduro de *C. xanthocarpa*

No presente trabalho, depois de trinta e nove dias da polinização cruzada controlada, foi possível avaliar a disposição dos frutos (Figura 7A) desenvolvendo-se muito próximos uns dos outros, suspensos por pedúnculo individualizado e inseridos nas gemas axilares das folhas. As bagas apresentaram coloração alaranjada, diâmetro médio de 30mm, com as sépalas verdes ainda presentes (Figura 7B).

Quando maduros, os frutos de *C. xanthocarpa* mostraram pericarpo que pode ser visualmente separado em 3 regiões como decorrência das características histológicas. Uma região externa, cujo tecido apresentou-se mais compacto, uma região mediana com tecido formado por espaços perceptíveis e uma região interna, próxima aos lóculos onde se encontravam as sementes, cujo tecido mostrou-se mais compactado. Como não foram realizadas análises mais aprofundadas sobre a ontogênese destes tecidos, optou-se pela denominação geral, pericarpo, o qual está constituído por regiões externa, média e interna (Figura 7C).

Em secção transversal do fruto, na região externa do pericarpo, através da microscopia eletrônica de varredura, foi possível distinguir as saliências das glândulas de óleo subepidérmicas e na região interna do fruto, as glândulas plenamente desenvolvidas (Figura 7D). Os tricomas mantiveram-se persistentes na epiderme uniestratificada e as glândulas de óleo mostraram-se constituídas por células secretoras que delimitam ampla cavidade (Figura 7E). Secções paradérmicas mostraram grande quantidade de glândulas abaixo do tecido epidérmico, sendo que o conteúdo destas estruturas glandulares mostrou reação positiva ao sudan III, indicando conteúdo de natureza lipídica (Figura 7F). Na epiderme também foram evidenciados estômatos (Figura 7G).

A vascularização (Figura 7H) se mostrou intensa na região mediana do pericarpo. A quantidade de tecidos de condução pode ser explicada pelo desenvolvimento das células desta região, que se alongaram, expandiram e aumentaram em volume, formando a polpa dos frutos. O tecido parenquimático, adjacente aos feixes vasculares (Figura 7H), estava constituído por células que armazenam nutrientes e água, que são translocados via feixes vasculares até a região mediana do pericarpo. Nesta região do pericarpo, também foram detectadas células que mostraram suas paredes espessadas e lignificadas, evidenciando reação positiva ao floroglucinol acidificado (Figura 7I), caracterizando-se como esclereídes, dispostas em grupos ou isoladas. Secções transversais do fruto, observadas em microscopia eletrônica de

varredura, mostraram a região interna do pericarpo formada por células mais compactas e delimitada internamente pela parede locular uniestratificada. Esta região é rica em glândulas de óleo que, nesta etapa de desenvolvimento dos frutos, encontram-se cobrindo o tegumento seminal (Figura 7J). O amadurecimento dos frutos mostrou-se de forma escalonada, havendo frutos maduros crescendo ao lado de frutos imaturos ou verdes, refletindo o desenvolvimento também escalonado das flores, sendo esta uma característica típica de espécies não domesticadas. Os atributos sensoriais eram suficientes para o consumo *in natura* e o preparo de doces e sucos, sendo considerados aptos para a colheita.

As espécies de Myrtoideae têm seus frutos classificados como bagas por diferentes autores (Barroso *et al.* 1991, Judd *et al.* 1999). A baga é considerada um fruto simples, carnoso, uni a pluricarpelar e uni a plurispérmico, ocorrendo em várias famílias botânicas (SOUZA, 2006). Barroso *et al.* (1999) classificaram os frutos das Myrtaceae sul-americanas como bacóides, que são frutos carnosos e indeiscentes, com pericarpo muito ou pouco espessado e endocarpo formado apenas pela epiderme interna, que nunca é lenhosa, esclerificada ou coriácea, e com número de sementes variável. Para o gênero *Campomanesia*, os autores classificaram os frutos como campomanesoídeos, cujo pericarpo é carnoso e há um tecido pulposo central, no qual os lóculos dispõem-se radialmente. Sanchotene (1989) classifica os frutos de *C. xanthocarpa* como bagas globosas, achatadas nos pólos, coroadas por sépalas verde-arroxeadas, suspensas por um pedúnculo com cerca de 2 cm de comprimento. Acrescenta que o exocarpo é liso, fino e, quando maduro, amarelo; o mesocarpo é doce, amarelo, sucoso, abrigando de 1 a 32 sementes.

Os elevados teores de compostos fenólicos (1616 ppm/100g) e vitamina C (233,56 mg/100g), de acordo com Santos (2009), qualificam o fruto como alimento funcional e a textura pode ser atribuída ao alto teor de pectinas. Conforme o autor, estes podem ser consumidos *in natura* ou usados para preparar geléias e licores, apresentando potencial tecnológico devido às suas propriedades sensoriais e nutritivas. Segundo Roth (1977), a presença de tricomas é mais efetiva em frutos jovens e estão relacionados à redução da transpiração e proteção, especialmente quando a cobertura por cutícula ou ceras não se completou. Em *C. xanthocarpa* a epiderme é delgada, o que pode explicar a manutenção dos tricomas nos frutos maduros. Coneglian (2007) constatou que em *C. pubescens*, os tricomas não estavam presentes na maturação. As demais características desta região do pericarpo, descritas por esta autora, são

semelhantes ao que foi constatado em *C. xanthocarpa*. Em *Myrcia bella* e *C. pubescens* os conteúdos das cavidades secretoras em desenvolvimento e em atividade de secreção, reagiram positivamente aos testes com cloreto férrico e acetato de cobre associado a ácido rubeânico, indicando a presença de compostos fenólicos lipossolúveis, e cujo conteúdo secretado é lipídico (reage positivamente aos testes com vermelho de sudan IV e preto de sudan B). Análises realizadas no óleo volátil de *C. xanthocarpa* identificaram 62 componentes, correspondendo a 100% dos constituintes do óleo, destacando-se dentre eles os monoterpenos α -pineno (15%), *o*-cimeno (10,8%), β -pineno (10,5%) (VALLILO, 2008). Segundo as observações de Landrum (1986), em frutos de *Campomanesia* encontrados parcialmente comidos sob as árvores, os lóculos foram evitados devido ao sabor produzido pelas secreções das glândulas presentes nesta região, o que manteve a integridade das sementes. Souza (2006) descreve a epiderme desta região nos frutos como formada por células com paredes periclinais externas espessas e cuticularizadas, podendo ser glabra ou não e estomatífera. Frutos *in natura* de *C. xanthocarpa*, avaliados quanto à composição nutricional e ao teor de elementos inorgânicos, mostraram alto teor de água (81,4%), lipídios (1,9%), carboidratos totais (8,9%), fibra alimentar (6,3%), além de quantidades razoáveis de ácido ascórbico (17,8 mg.100 g⁻¹), e traços de riboflavina (0,09 mg.100 g⁻¹) (SANTOS, 2009). Entre os minerais (16), os principais elementos foram o K, P, Mg e, como microelementos, o Fe, Cu e Pb. O valor energético do fruto (57,3 kcal.100 g⁻¹) deve-se quase que exclusivamente aos teores de carboidratos totais (8,9%) (VALLILO, 2008).

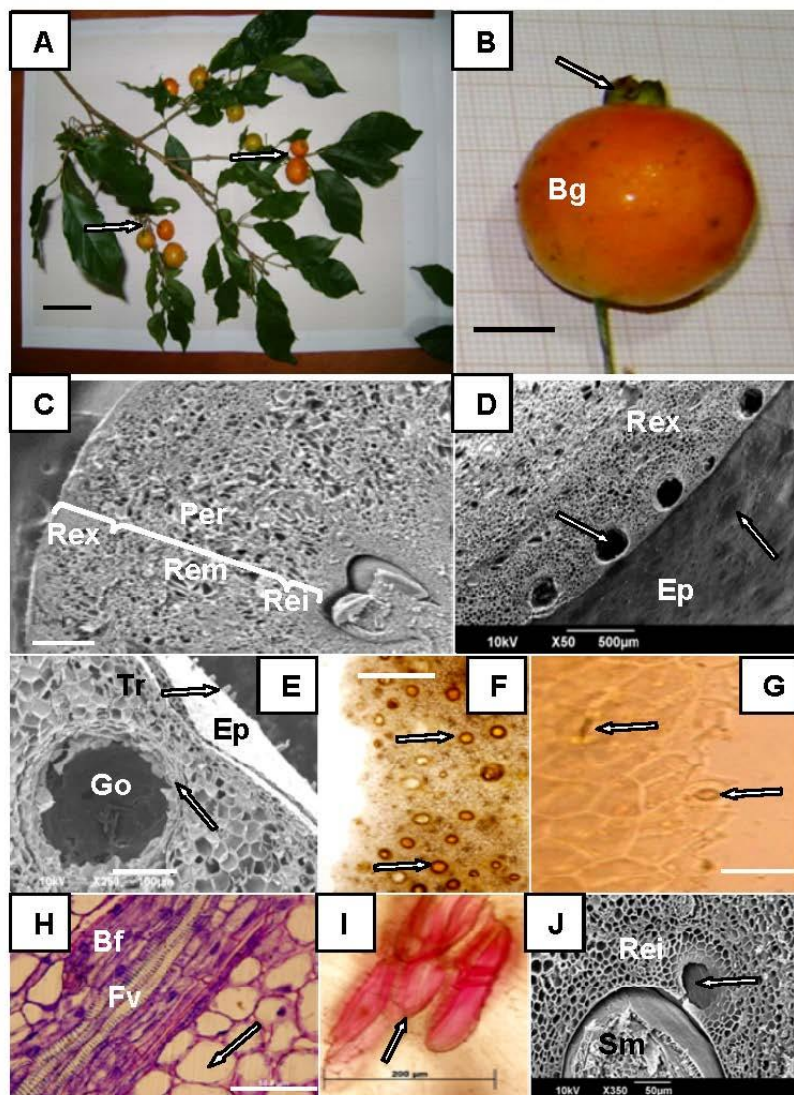


Figura 7 - Fruto de *C. xanthocarpa*, 39 dias após a polinização (936h DP).

A) Ramos com frutos desenvolvendo-se nas regiões axilares das folhas (setas). **B)** Fruto maduro do tipo campomanesoídeo (baga globosa) com sépalas persistentes (seta). **C)** Eletromicrografia de varredura do pericarpo (Per) do fruto distinguindo-se três regiões: externa (Rex), mediana (Rem) e interna (Rei). **D)** Parede do fruto, destacando as glândulas de óleo evidentes (seta) subepidérmicas e na secção transversal mostrando as cavidades glandulares espalhadas pela região externa; **E)** Detalhe da região periférica do pericarpo, mostrando tricomas na epiderme e glândula de óleo com células delimitando ampla cavidade (seta). **F)** Secção paradérmica do pericarpo evidenciando reação positiva ao sudan III (setas) para conteúdo lipídico das glândulas de óleo. **G)** Secção paradérmica da epiderme com presença de estômatos (setas). **H)** Feixes vasculares na região mediana do pericarpo, entre células parenquimáticas (seta). **I)** Esclereídes agrupados na região mediana do pericarpo, com as paredes espessadas e lignificadas, evidenciando reação positiva à presença de lignina com floroglucinol acidificado (seta). **J)** Eletromicrografia de varredura de secção transversal na região interna do pericarpo, destacando presença de glândula de óleo (seta), muito próxima ao rudimento seminal. Barras = 1cm (A), 10mm (B), 500µm (C,D), 10µm (E), 200µm (F,G,I), 1mm (H), 50µm (J). Bg = baga globosa, Per = pericarpo, Rex = região externa, Rem = região mediana, Rei = região interna, Ep = epiderme, Go = glândula de óleo, Tr = tricoma, Bf = bainha do feixe, Fv = feixe vascular, Sm = semente.

2.4 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SEMENTE E DO EMBRIÃO MADURO DE *C. XANTHOCARPA*

No presente trabalho, aos 39 dias da polinização cruzada controlada, as análises morfológicas nas sementes maduras de *C. xanthocarpa*, mostraram a presença de uma cobertura mucilaginosa e a adesão do pericarpo rico em glândulas de óleo sobre as sementes. Pode-se perceber uma região mediana mais escura sob o pericarpo, tratando-se da hipóstase (Figura 8A). Sob o microscópio de varredura pode-se ver parte do pericarpo aderido como um falso tegumento seminal (Figura 8C e 8D). As glândulas de óleo (Figura 8D), quando rompidas, espalharam sobre o embrião seus conteúdos ricos em fenóis e lipídeos, os quais atuam como dissuasivos alimentares, antioxidantes e protetores contra dessecação. Sem a cobertura do pericarpo as sementes se apresentaram com formato reniforme e achatado dorsiventralmente, com a superfície externa do tegumento seminal sem a presença de glândulas (Figura 8B). Não foi constatada a presença do endosperma, nesta fase em que o embrião já ocupava inteiramente o interior da semente, fato que determina tratar-se de semente exalbuminosa.

Quando foram removidas parcialmente as estruturas mucilaginosas, o pericarpo e o tegumento das sementes, foi possível visualizar o embrião sob o microscópio eletrônico de varredura (Figura 8C). Depois da retirada dos envoltórios, o embrião foi extraído mostrando a forma típica de um embrião mirtóide (Figuras 8E e 8F) também denominado pimentóide, que estava alojado dentro de uma semente com testa cartilaginosa. O embrião mostrou-se constituído por eixo hipocótilo-radicular conspícuo e engrossado, sendo os cotilédones muito pequenos (Figuras 8E e 8F).

Segundo Paoli (2006), a semente, nas Angiospermae, é o óvulo maduro e fecundado a partir do processo de dupla fecundação, formada pelo esporófito jovem (embrião), por um tecido alimentar (endosperma) e por um envoltório protetor, constituindo a unidade de dispersão da espécie. Nas Myrtoideae, as sementes variam em tamanho, estrutura do tegumento, morfologia do embrião (NIC LUGHADHA & PROENÇA, 1996) e na espessura da testa (MCVAUGH, 1968). Segundo Landrum (1986), parte do pericarpo aderido é uma característica aparentemente restrita ao gênero *Campomanesia*, dentro das Myrtaceae. Segundo Nic Lughadha & Proença (1996) a presença de glândulas de óleo no embrião também é uma característica encontrada em Myrtoideae, porém em *C. xanthocarpa* não foram encontradas estruturas secretoras no embrião, mas sim sobre eles.

A hipóstase pode ser impregnada por cutina, suberina, lignina ou calose e suas células podem conter compostos fenólicos, proteína, amido e reservas lipídicas, que podem persistir nas sementes maduras (PAOLI, 2006). Segundo Bouman (1984), esta estrutura pode ser uma barreira que limita o crescimento do saco embrionário, uma ligação entre o suprimento vascular e o saco embrionário, controlar o balanço hídrico de sementes dormentes, exercer proteção nas sementes maduras ou fornecer reservas alimentares ao embrião. Nesta espécie, a hipóstase persistente pode estar ligada à proteção e à alimentação do embrião no momento da germinação. Em *C. pubescens*, *Eugenia punicifolia* e *Myrcia bella*, Coneglian (2007) constatou a presença da hipóstase expandida e evidente nas sementes maduras, composta por células com depósitos fenólicos, características que Werker (1997) considerou como uma hipóstase *lato sensu*. Pescador *et al.* (2009) observaram a presença da hipóstase nos óvulos de *Acacia sellowiana*. A hipóstase persistente foi referida por Von Teichman & Van Wyk (1991) como comum em Myrtaceae e em outras 80 famílias de Dicotiledôneas.

As análises estruturais revelaram que o tegumento da semente não apresenta glândulas na epiderme, conforme declarado por Berg (1997), para as espécies de *Campomanesia*. Semelhantes resultados foram encontrados por Coneglian (2007), para *C. pubescens*. Landrum & Kawasaki (1997) consideraram que o tegumento seminal de espécies do gênero *Campomanesia* não é distinguível na semente madura, devido à sua pequena espessura. Dados sobre a espessura dos tegumentos maduros e sua estrutura, durante o desenvolvimento da semente, podem ter significado para comparações entre grupos (TOBE & RAVEN, 1983) e, em muitas espécies e gêneros, o conhecimento da estrutura da semente madura pode ser essencial para a disposição apropriada do táxon (MCVAUGH, 1968).

A ausência de endosperma em sementes maduras é característica da ordem Myrtales (TOBE & RAVEN 1983). Segundo Landrum & Stevenson (1986), a ausência de endosperma em sementes maduras é consequência da transferência da função de armazenamento de energia do endosperma para diferentes partes do embrião, tais como cotilédones (Em Eugeniinae), embrião como um todo (em Myrciinae), ou no hipocótilo (em Myrtinae).

Santos (2004), trabalhando com sementes de *C. xanthocarpa*, encontrou alto índice de sementes “vazias” (óvulos abortados) e problemas de sanidade relacionados à presença de larvas de insetos, ficando disponível para a semeadura, cerca de 50% do material beneficiado. No momento da dispersão apresentaram 33% de umidade,

sendo classificadas como recalcitrantes. De acordo com o conceito de Cavalcante & Perez (1995), em presença de luz, a faixa de máxima germinabilidade situou-se em temperaturas de 15 a 30°C. A temperatura ótima de germinação, conceito estabelecido por Labouriau (1983), ficou em 25°C, demonstrando seu alto potencial adaptativo, possibilitando sua instalação em locais sombreados ou à sol pleno, habitando o interior ou a orla das matas, embora prefira os sítios úmidos da Floresta Ombrófila Densa e Floresta Estacional Caducifólia.

A morfologia dos embriões de Myrtoideae é de grande importância taxonômica (LANDRUM & KAWASAKI, 1997), sendo o principal caráter para definição das subtribos (BARROSO *et al.*, 1999). No caso de *C. xanthocarpa*, o embrião mirtoide está relacionado à subtribo Myrtinae. O embrião de *Campomanesia* é classificado por Rotman (1976) e Landrum & Kawasaki, (1997) como espiralado, com dois cotilédones foliáceos pequenos, hipocótilo alargado e radícula livre.

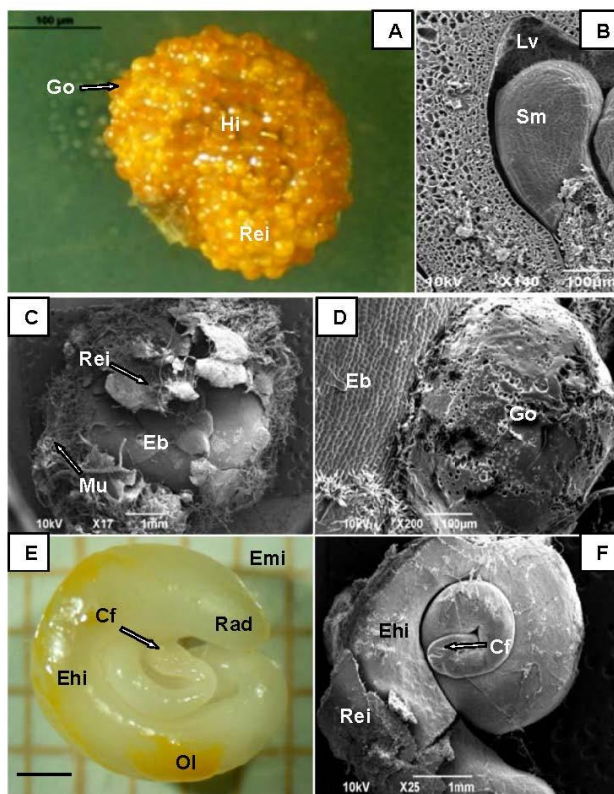


Figura 8 - Semente e embrião de *C. xanthocarpa* 39 dias após a polinização (936h DP). **A)** Semente recoberta pela parede interna do fruto, com glândulas de óleo, permitindo a visualização da hipóstase que se apresenta como uma mancha marrom mais escura na região central, **B)** Semente propriamente dita, alojada na cavidade locular mostrando o tegumento externo. **C)** Eletromicrografia de varredura com o embrião sob a camada de mucilagem e o envoltório formado pela região interna do pericarpo. **D)** Detalhe da glândula de óleo sobre o embrião. **E)** Embrião mirtóide, sob o microscópio estereoscópio, formado por eixo hipocótilo-radicular engrossado e cotilédones foliáceos minúsculos, apresentando depósito de óleo proveniente das glândulas do pericarpo. **F)** Eletromicrografia do embrião mirtóide, exibindo os cotilédones foliáceos, o eixo hipocótilo-radicular e restos da região interna do pericarpo. Barra = 1mm (E). Go = glândula de óleo, Hi = hipóstase, Rei = região interna do pericarpo, Lv = lóculo, Sm = semente, Eb = embrião, Mu = mucilagem, Emi = embrião mirtóide, Rad = radícula, Cf = cotilédone foliáceo, Ehi = eixo hipocótilo-radicular, Ol = óleo.

3 – CONCLUSÃO

As análises do desenvolvimento de embriões, sementes e frutos de *Campomanesia xanthocarpa* permitiram concluir que:

1. Os frutos levam, cerca de, 42 dias para se desenvolverem num padrão sigmoidal que pode ser dividido em 5 estádios de desenvolvimento.
2. Devido às estruturas ovarianas formadoras do fruto já estarem presentes na pré-antese, esta fase de desenvolvimento da flor foi incluída como estádio I.
3. O estádio II é o mais longo (30 dias) e abrange eventos de fundamental importância como a fecundação, a embriogênese com a formação dos proembriões, dos embriões globulares, dos embriões nos estádios cordiforme e de torpedo, até sua forma mirtoide definitiva. As principais estruturas formadoras da semente são formadas neste período.
4. O estádio III de desenvolvimento marca o início do amadurecimento perceptível dos frutos através da mudança de coloração e grande aumento em diâmetro, provavelmente ligado ao acúmulo de reservas.
5. O estádio IV é um período rápido (2 dias) de amadurecimento pleno dos frutos com aprimoramento de padrões sensoriais.
6. O estádio V é o início da rápida senescência dos frutos climatéricos da espécie.
7. Os estádios de desenvolvimento II e III são os mais críticos em relação a estresses bióticos ou abióticos no desenvolvimento de embriões, sementes e frutos desta espécie.
8. Os frutos apresentam estruturas de proteção desde a epiderme, através dos tricomas e glândulas de óleo até as regiões mais internas. Para garantir a dispersão das sementes, a espécie investiu na região mediana do pericarpo, através da presença de esclereídes que dão a sustentação necessária ao tecido parenquimático rico em substâncias nutritivas. As células deste tecido são supridas com fotoassimilados e água através da rede de feixes vasculares, garantindo a recompensa para os dispersores.
9. Embora as sementes estejam estruturadas de modo a proteger o embrião, recobrimdo-o com mucilagem e substâncias contidas nas glândulas de óleo e tenha providenciado uma reserva alimentar no eixo hipocótilo-radicular e na hipóstase, a característica recalcitrante e o curto período de viabilidade apresentados dificulta sua utilização.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA.E.J. de, JESUS, N. de, MARTINS, A.B.G. Fenologia do florescimento e frutificação do *Dovialis*. **Científica**, v.39 n.1/2, p. 79-84. 2011.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114p.

BARROS, S.S.U. de. Anatomia e ontogênese dos frutos e sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. (Fabaceae: Mimosoideae). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP. 2002.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, v.12. 1991.

BARROSO, G.M., MORIN, M.P., PEIXOTO, A.L., ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Ed. da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 1999.

BERG, O. Myrtaceae. In: VON MARTIUS, C.F.P. (Ed). **Flora Brasiliensis**. Part 1. Lipsiae: Frid. Fleischer in Commu, 1857-1859. v.14, p.1-655 *apud* LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, p.508-536, 1997.

BOUMAN, F. The ovule. In: JOHRI, B.M. (Ed.) **Embriology of Angiosperms**. Springer-Verlag: New York. 1984.

CAVALCANTE, A.M.B. & PEREZ, S.C.J.G.A. Efeitos da temperature sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Revista Brasileira de Sementes**, 17 (1): 1-8. 1995.

CAVE, M.C. Structure et developpement du fruit. **Annales des Sciences Naturalles Botaniques**, v.5, n.10, p.123-190. 1869.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de Frutas e Hortalças: Fisiologia e Manuseio**. 2 ed. UFLA, Lavras. 2005.

CONEGLIAN, I.R.M. Morfologia e ontogênese do pericarpo e semente de *Eugenia punicifolia* (H.B. & K.) DC, *Myrcia bella* Camb. e *Campomanesia pubescens* (DC) Berg (Myrtaceae). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual de Campinas. 2007.

COOMBE, B.G. The development of fleshy fruits. **Annual Review of Plant Physiology**, v. **27**, p. 507-528. Palo Alto. 1976.

FRANZON, R.C., RASEIRA, M.C.B., WAGNER JUNIOR, A. Germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.). **Revista Ceres** **53**, n.305. 2006.

FRANZON, C.R. Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Tese (Doutorado em Ciências)**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS. 2008.

GONZÁLEZ, D.V.; HERNÁNDEZ, M.S.; HERRERA, A.; BARRRERA, J.A.; MARTINEZ, O.W.; PAEZ, D. Desarrollo del fruto e índices de cosecha de la carambola (*Averrhoa carambola* L.) producida en el Piedemonte Amazonico Colombiano. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v.3, n.2, p.144-154. Cidade do México. 2001.

GORTNER, W.A.; DULL, G.G., KRAUSS, B. H. Fruit development, maturation, ripening, and senescence: A biochemical basis for horticultural terminology. **HortScience**, v. **2**, n. **4**, p. 141-144. Alexandria. 1967.

HORRIDGE, G.A. & TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science** **163**: 817-818. 1969

HULME, A.C. **The Biochemistry of fruits and their Products**. London: Academic Press, 618p. 1970.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 1999.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Washington. 1983.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, p.508-536, 1997.

LANDRUM, L.R. The development of the fruits and seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittonia**, v.34, p.220-224, 1982.

LANDRUM, L.R. *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica. Monogr.** 45. New York Botanical Garden, New York. 1986.

LANDRUM, L. R. & STEVENSON, D. Variability of embryos in subtribe Myrtinae (Myrtaceae). **Systematic Botany** 11:155-162. 1986.

MCVAUGH, R. The genera of american Myrtaceae – an interim report. **Taxon**, v.17, p.354-418, 1968.

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR. N. S. Flor. In. **Anatomia vegetal**. Ed. APEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; Viçosa, UFV, 437p. 2006.

MARTINS, L.P., SILVA, S de M., ALVES, R.E., FILGUEIRAS, H.A.C. Desenvolvimento de frutos de cirigueleira (*Spondias purpurea* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.1, Jaboticabal/SP. 2003.

MAUSETH, J.D. **Plant anatomy**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. 1988.

MCDOWELL, E.M. & TRUMP, B. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 100: 405-414. 1976.

NIC LUGHADHA, E.N. & PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 83:480-503. 1996.

NITSCH, J.P. The physiology of fruit growth. **Ann. Review of Plant Physiology**, v.4, p. 199-236. 1953.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. & MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** **59**: 368-373. 1964.

OLIVEIRA, D.M.T. Morfologia e desenvolvimento dos frutos, sementes e plântulas de *Inga fagifolia* Willd. e *Inga uruguensis* Hook. ET Arn. (Fabaceae, Mimosoideae). **Tese (doutorado)**, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1991.

PAOLI, A.A.S. Semente. In: **Anatomia do fruto e da semente**. SOUZA, L.A de (Org.) Ed. UEPG, Ponta Grossa/PR. P.200. 2006.

PESCADOR, R., KERBAUY, G.B., STRASSBURG, R.C., KRAUS, J.E. Structural aspects of the zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasilica**, **23** (1), p. 136-0144. 2009.

ROTH, I. **Fruits of Angiosperms**. Gebruder Borntraeger, Berlim. 1977.

ROTMAN, A.D. 1976. Revisión del género *Campomanesia* en la Argentina (Myrtaceae). **Darwiniana** **20**:327-340.

SALOMÃO, L.C.C., SIQUEIRA, D.L.de, PEREIRA, M.E.C. Desenvolvimento do fruto da lichieira (*Litch chinensis* Sonn.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. **28**, n.1, Jaboticabal/SP. 2006.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. 2. ed. Porto Alegre: SAGRA, 1989.

SANTOS, C.M.R., FERREIRA, A.G., ÁQUILA, E.A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v.14, n2. P.13-20. 2004.

SANTOS, M. da S.; CARNEIRO, P.I.B.; WOSIACKI, G.; PETKOWICZ, C.L.de O.; CARNEIRO, E.B.B. Caracterização físico-química, extração e análise de pectinas de frutos de *Campomanesia xanthocarpa* B. (Gabiroba). **Semina: Ciências Agrárias**, vol30, n1. Londrina. PR. 2009.

SOUZA, L. A. Anatomia do desenvolvimento do pericarpo de *Lonchocarpus muehlbergianus*. Hassler (Leguminosae Faboideae). **Revista Unimar**, v.6, n.1, p.5-19, 1984.

SOUZA, L. A. Morfo-anatomia do desenvolvimento do fruto de *Acacia paniculata* Willd, (Leguminosae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.36, n.4, p. 851-871. 1993.

SOUZA, L. A. de **Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula**. Ed. UEPG. Ponta Grossa – PR. 2003.

SOUZA, L. A. **Anatomia do fruto e da semente**. Ed. UEPG. Ponta Grossa – PR. 2006.

SOUZA, L. A. **Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação**. Ed. TODAPALAVRA. Ponta Grossa – PR. 2009.

TOBE, H.; RAVEN, P.H. An embryological analysis of Myrtales: its definition and characteristics. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v.70, p.71-94, 1983.

VALLILO, M.I.; MORENO, P.R.H.; OLIVEIRA, E. de; LAMARDO, L.C.A.; GARBELOTTI, M.L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg – *Myrtaceae*. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 28. Sppl.0. Campinas. SP. 2008.

VON TEICHMAN, I. & VAN WYK, A.E. 1991. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. **Botanical Journal of the Linnean Society** 105:211-237.

WARRINGTON, L.J.; FULTON, T.A.; HALLIGAN, E.A. SILVA, H.N. Apple fruit growth and maturity are affected by early season temperatures. **Journal American Society Horticultural Science, Alexandria**, v.124, n.5, p. 468-477, 1999.

WERKER, E. **Seed anatomy**. Berlim, Gerbrüder Borntraeger. 1997.

YEUNG, E.C., MEINKE, D.W. Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. **The Plant Cell**, v.5, p. 1371-1381. 1993.

ZHANG, D.P. The relationship between structures of fruit stalks and fruit dropping in litchi. **Acta Horticulturae Sinica**, v.24, n.2, p.105-10. Beijing. 1997.